

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología



TESIS DOCTORAL

**Detección y caracterización molecular de microsporidios,
Cryptosporidium spp. y *Cyclospora* spp. en aguas potables, residuales y
recreacionales de la zona centro de España**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Luz Galván Díaz

Directoras

Carmen del Águila de la Puente
Soledad Fenoy Rodríguez

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DE MICROSPORIDIOS, *CRYPTOSPORIDIUM*
SPP. Y *CYCLOSPORA* SPP. EN AGUAS
POTABLES, RESIDUALES Y RECREACIONALES
DE LA ZONA CENTRO DE ESPAÑA**

TESIS DOCTORAL

ANA LUZ GALVÁN DÍAZ

Madrid, 2013



UNIVERSIDAD SAN PABLO CEU
FACULTAD DE FARMACIA



Universidad San Pablo-CEU
Facultad de Farmacia

CARMEN DEL AGUILA DE LA PUENTE, Profesora Catedrática y SOLEDAD FENOY RODRIGUEZ, Profesora Titular, de la Universidad San Pablo CEU.

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**Detección y caracterización molecular de microsporidios, *Cryptosporidium* spp. y *Cyclospora* spp. en aguas potables, residuales y recreacionales de la zona centro de España**" que ha sido realizada por Dña Ana Luz Galván Díaz, en el laboratorio de parasitología de la Universidad San Pablo CEU, para optar al grado de doctora por la Universidad Complutense de Madrid, bajo nuestra dirección.

Madrid, 19 de Septiembre de 2013

Fdo: Dra. Carmen del Aguila

Fdo: Dra. Soledad Fenoy

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS Y MI ADORADO SOBRINO

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas aquellas personas e instituciones que han contribuido directa o indirectamente en la realización de este trabajo, y de manera muy especial:

A mis Directoras de Tesis, Dra. Carmen del Águila de la Puente y Dra. Soledad Fenoy Rodríguez, por haberme permitido formar parte de su equipo de investigación, ofreciéndome la posibilidad de desarrollar esta Tesis Doctoral; por sus valiosos consejos, asesorías y apoyo constante.

A mis profesores de parasitología de la Universidad de Antioquia, quienes creyeron en mí y me abrieron las puertas de la universidad. Nunca olvido sus enseñanzas ni su continuo apoyo: Sonia, Jorge, Martha Nelly, Liliam, Norma, Martha Inés y Amanda.

A mis compañeros y aun mas importante amigos del superlaboratorio de parasitología del CEU y sus asociados: Fernando, Angela, Carmen, Angélica, Sergio, Loli, Carola, Javi, Thiago, Regina, Alex, Cristina, María, Lourdes, Sandra, Natalia, Soraya, Pamela... los llevo en este corazón de hielo y piedra, no hay palabras para agradecerles todos los momentos (yeah maracuyeah) que compartimos. Esta vez no hay necesidad de "interpretar mi silencio": Los quiero mucho!!!!!!!!!! En Colombia tienen una amiga, y espero que alguno me pueda visitar, ustedes saben que Colombia siempre viene bien!!!!

A mis amigos del alma mater en Colombia: Gisela, Katherine, Víctor, Carolina, Luz Elena y José Ignacio. Por estar siempre ahí para mí, por escucharme, por apoyarme, por comprenderme, por aguantarme, por reírse de mis chistes malos, por resolver mis múltiples problemas domésticos, por ser mi familia en Medellín; puedo estar un poco repetitiva: Los quiero mucho también!!!!!!!!

Al señor, profesor, Dr Rúa Giraldo: Alvarin, mi compañero de oficina, de facultad, de viajes, de aventuras. Gracias por darme ánimos, por seguirme la

corriente y embarcarnos en esta travesía doctoral hace ya casi 5 años, lo veíamos muy pero que muy lejano, pero todo llega!!!!

A Ana Cecilia y Mónica, por los momentos de apoyo, de diversión, de risas, de tapas, de cañas, por su compañía y su amistad incondicional.

A los vegetales, Alfonso, Elena, Dani y en especial a mi abogado Jorge "Cherry" y a los bioquímicos, Julio y Javi; gracias por su amistad y compañía durante estos años.

A Zaira, Ana, María y Fran, por brindarme su amistad y por todos los momentos divertidos que pasamos en los viajes maratónicos en los que tuve la fortuna de tenerlos como compañeros.

A Angela, Laiana, Livia y Mayito, por los casi 4 años que compartí con ustedes y en los que me hicieron sentir como una más de su familia.

Al laboratorio de parasitología de la Universidad de Antioquia: Angélica, Ana María, Jairo, Dora, María Elena, Mary, Juan Fernando, Juan Gonzalo, María Cristina.

Al Dr Nuno Henriques Gil, por sus valiosas aportaciones en el diseño experimental, análisis de resultados y discusión de los manuscritos que hacen parte de esta tesis doctoral.

Al Dr Francisco Bolás Fernández, por su enorme ayuda y asesoría en cuanto a los trámites relacionados con la inscripción de la tesis doctoral.

Al Dr Antonio Clavel Parrilla y la Dra María Pilar Goñi Cepero, del departamento de Microbiología, medicina preventiva y salud pública, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza, por el entrenamiento en el diagnóstico molecular de *Cryptosporidium*.

A la Universidad San Pablo CEU por facilitar el desarrollo de esta tesis en sus instalaciones.

A la Universidad de Antioquia, por facilitar mi estancia en España y poder realizar el doctorado; por la formación académica que me ha brindado desde que ingresé a sus aulas, por darme la oportunidad de crecer no solo como estudiante sino también como docente. Me siento muy orgullosa de pertenecer a esta institución. Gracias Alma mater!!!

A la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia.

Al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la tecnología COLCIENCIAS, por haber financiado los estudios de doctorado mediante la beca para estudios en el exterior.

Por último y no por ello menos importante, a toda mi familia. A mis padres y mis hermanos quienes siempre han confiado en mí y me han impulsado para seguir mis sueños y cumplir mis metas. A todos mis primos, tíos y abuelos, por su interés y apoyo durante estos años.

INDICE

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| INDICE DE TABLAS | xiii |
| INDICE DE FIGURAS | xiii |
| RESUMEN | xvi |
| SUMMARY | xx |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Antecedentes y estado actual del tema | 4 |
| 1.2 Microsporidios | 9 |
| 1.2.1 Taxonomía y filogenia | 10 |
| 1.2.2 Morfología | 15 |
| 1.2.3 Organización genómica | 17 |
| 1.2.4 Diversidad genética de los principales microsporidios patógenos para humanos | 24 |
| 1.2.4.1 <i>Enterocytozoon bieneusi</i> | 25 |
| 1.2.4.2 <i>Encephalitozoon cuniculi</i> | 28 |
| 1.2.4.3 <i>Encephalitozoon hellem</i> | 29 |
| 1.2.4.4 <i>Encephalitozoon intestinalis</i> | 31 |
| 1.2.5 Ciclo de vida | 32 |
| 1.2.5.1 Fase de infección | 32 |
| 1.2.5.2 Fase proliferativa o merogonia | 35 |
| 1.2.5.3 Fase de Maduración o esporogonia | 36 |
| 1.2.6 Manifestaciones clínicas..... | 37 |
| 1.2.6.1 Infecciones intestinales | 37 |
| 1.2.6.2 Infecciones diseminadas..... | 38 |
| 1.2.6.3 Infecciones oculares..... | 39 |
| 1.2.6.4 Sinusitis..... | 39 |
| 1.2.6.5 Infecciones pulmonares..... | 40 |
| 1.2.6.6 Infecciones del tracto urinario y genital | 40 |
| 1.2.6.7 Miositis..... | 41 |
| 1.2.6.8 Infecciones cerebrales..... | 41 |
| 1.2.7 Epidemiología | 43 |
| 1.2.7.1 Distribución geográfica y prevalencia en humanos | 43 |

| | |
|------------------------------------------------------------------|----|
| 1.2.7.2 Fuentes de infección y modos de transmisión | 51 |
| 1.2.7.2.1 Potencial zoonótico | 51 |
| 1.2.7.2.2 Transmisión hídrica | 53 |
| 1.2.7.2.3 Transmisión a través de alimentos | 54 |
| 1.2.7.2.4 Transmisión por artrópodos | 55 |
| 1.2.8 Diagnóstico | 56 |
| 1.2.8.1 Microscopia electrónica (MET)..... | 56 |
| 1.2.8.2 Microscopia óptica..... | 57 |
| 1.2.8.3 Técnicas Inmunológicas | 60 |
| 1.2.8.3.1 Pruebas basadas en la detección de anticuerpos | 60 |
| 1.2.8.3.2 Pruebas basadas en la detección de antígenos..... | 61 |
| 1.2.8.4 Técnicas Moleculares..... | 62 |
| 1.2.8.4.1 Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia-FISH..... | 63 |
| 1.2.8.4.2 PCR..... | 63 |
| 1.2.8.4.3 Otros métodos | 66 |
| 1.2.8.5 Cultivo Celular | 67 |
| 1.2.9 Tratamiento..... | 67 |
| 1.2.9.1 Albendazol..... | 68 |
| 1.2.9.2 Fumagilina..... | 69 |
| 1.2.9.3 Nitazoxanida..... | 69 |
| 1.2.9.4 Terapia antirretroviral..... | 70 |
| 1.2.9.5 Otros fármacos | 70 |
| 1.3 <i>Cryptosporidium</i> spp. | 71 |
| 1.3.1 Taxonomía y filogenia | 72 |
| 1.3.2 Morfología | 76 |
| 1.3.3 Organización genómica | 78 |
| 1.3.4 Diversidad genética de <i>Cryptosporidium</i> spp..... | 80 |
| 1.3.5 Ciclo de vida..... | 83 |
| 1.3.6 Manifestaciones clínicas..... | 87 |
| 1.3.7 Epidemiología | 90 |
| 1.3.7.1 Distribución geográfica y prevalencia en humanos | 90 |
| 1.3.7.2 Fuentes de infección y modos de transmisión | 91 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1.3.7.2.1 Potencial zoonótico | 92 |
| 1.3.7.2.2 Transmisión hídrica | 93 |
| 1.3.7.2.2.1 Método 1623..... | 99 |
| 1.3.7.2.3 Transmisión a través de alimentos | 100 |
| 1.3.8 Diagnóstico | 101 |
| 1.3.9 Tratamiento..... | 104 |
| 1.4 <i>Cyclospora</i> spp. | 106 |
| 1.4.1 Taxonomía, filogenia y diversidad genética..... | 107 |
| 1.4.2 Morfología | 109 |
| 1.4.3 Ciclo de vida | 109 |
| 1.4.4 Manifestaciones clínicas..... | 111 |
| 1.4.5 Epidemiología | 111 |
| 1.4.5.1 Distribución geográfica y prevalencia en humanos | 111 |
| 1.4.5.2 Fuentes de infección y modos de transmisión | 112 |
| 1.4.5.2.1 Transmisión a través de alimentos | 112 |
| 1.4.5.2.2 Transmisión hídrica | 113 |
| 1.4.5.2.3 Potencial zoonótico | 114 |
| 1.4.6 Diagnóstico | 115 |
| 1.4.6.1 Microscopía óptica..... | 115 |
| 1.4.6.2 Microscopía de fluorescencia..... | 116 |
| 1.4.6.3 PCR..... | 116 |
| 1.4.7 Tratamiento..... | 117 |
| 1.5 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO | 119 |
| 2. OBJETIVOS..... | 123 |
| 2.1 OBJETIVO GENERAL | 125 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 125 |
| 3. ESTUDIOS EXPERIMENTALES..... | 127 |
| 3.1 Estudio 1: Molecular Characterization of Human-Pathogenic Microsporidia and <i>Cyclospora cayetanensis</i> Isolated from Various Water Sources in Spain: a Year-Long Longitudinal Study..... | 129 |
| 3.2 Estudio 2: A year-long study of <i>Cryptosporidium</i> species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. | 145 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3 Estudio 3: Molecular detection of microsporidia in domestic, farm and wild animals from Spain reveals the presence of potentially human-pathogenic <i>Enterocytozoon bieneusi</i> genotypes..... | 161 |
| 3.4 Estudio 4: First Cases of Microsporidiosis in Transplant Recipients in Spain and Review of the Literature | 183 |
| 3.5 Estudio 5: Variability in Minimal Genomes: Analysis of Tandem Repeats in the microsporidia <i>Encephalitozoon intestinalis</i> | 195 |
| 4. DISCUSION | 211 |
| 4.1 Frecuencia de microsporidios, <i>C. cayetanensis</i> y <i>Cryptosporidium</i> spp en aguas potables, residuales, superficiales y recreacionales y su variación estacional | 212 |
| 4.2 Distribución de especies de microsporidios, <i>Cyclospora</i> spp. y <i>Cryptosporidium</i> spp. en muestras ambientales..... | 220 |
| 4.3 Diversidad genética de microsporidios y <i>Cryptosporidium</i> spp. en aguas potables, residuales y recreacionales de la zona dentro de España | 224 |
| 4.4 Distribución de especies y diversidad genética de microsporidios en animales domésticos, de granja y silvestres de España | 227 |
| 4.5 Caracterización molecular de aislados de <i>E. bieneusi</i> procedentes de pacientes trasplantados de España | 229 |
| 4.6 Estudio de la variabilidad de cepas de <i>E. intestinalis</i> mediante la aplicación de nuevos marcadores genotípicos | 230 |
| 5. CONCLUSIONES | 235 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 238 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Características genómicas de varias especies de microsporidios | 19 |
| Tabla 2. Marcadores moleculares y genotipos descritos en <i>E. cuniculi</i> | 29 |
| Tabla 3. Marcadores moleculares y genotipos descritos en <i>E. hellem</i> | 31 |
| Tabla 4. Principales microsporidios asociados con infecciones en humanos ... | 42 |
| Tabla 5. Prevalencia de microsporidios a nivel mundial | 44 |
| Tabla 6. Microsporidiosis en España: estudios de prevalencia y descripción de casos..... | 50 |
| Tabla 7. Prevalencia de microsporidios en animales domésticos y silvestres de España | 52 |
| Tabla 8. Principales cebadores utilizados en el diagnóstico de especies de microsporidios patógenas para humanos | 65 |
| Tabla 9. Diferencias entre <i>Cryptosporidium</i> y los coccidios intestinales | 73 |
| Tabla 10. Especies del género <i>Cryptosporidium</i> | 74 |
| Tabla 11. Características genómicas de varias especies de <i>Cryptosporidium</i> . | 79 |
| Tabla 12. Principales familias de subtipos <i>gp60</i> | 81 |
| Tabla 13. Características clínicas de la criptosporidiosis | 89 |
| Tabla 14. Especies de <i>Cryptosporidium</i> descritas en aguas de España..... | 98 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1. Evolución taxonómica de los microsporidios | 11 |
| Figura 2. Espora de un microsporidio y sus principales componentes | 16 |
| Figura 3. Diferentes mecanismos de invasión de la célula hospedadora por esporas de microsporidios..... | 35 |
| Figura 4. Esporozoito de <i>Cryptosporidium</i> | 77 |
| Figura 5. Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp..... | 84 |
| Figura 6. Ciclo de vida de <i>Cyclospora</i> spp..... | 110 |

RESUMEN

Cryptosporidium spp., *Cyclospora cayetanensis*, y varias especies de microsporidios están reconocidos como patógenos emergentes en humanos. Estos parásitos tienen formas de resistencia que pueden permanecer viables durante largos periodos de tiempo en el ambiente y particularmente en el agua. Además en el caso de *Cryptosporidium* spp. y los microsporidios, se han descrito una variedad de reservorios animales, que pueden facilitar su diseminación por la contaminación ambiental con las heces. En los últimos años numerosas evidencias sugieren un papel importante del agua en la transmisión de estos parásitos. Adicionalmente, son pocos los datos relacionados con su presencia y diversidad genética, tanto en muestras ambientales como en muestras procedentes de humanos y animales. Teniendo en cuenta lo anterior, y con el objetivo de contribuir al conocimiento de la epidemiología de microsporidios, *Cryptosporidium* spp. y *Cyclospora* spp. en España, se realizaron varios estudios sobre su presencia, distribución de especies y diversidad genética en aguas potables, residuales, superficiales y recreacionales de la zona centro del país. Adicionalmente, se evaluó la presencia y variabilidad genética de los microsporidios patógenos para el hombre, en muestras clínicas de humanos y animales, mediante el uso de marcadores polimórficos tanto nuevos como ya descritos en la literatura.

En relación a las muestras ambientales, se observó una mayor frecuencia de los parásitos evaluados en las aguas afluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales y en las aguas superficiales y recreacionales. La mayoría de las especies identificadas se encuentran dentro de las descritas como patógenas para el hombre, incluyendo *C. cayetanensis*, *Cryptosporidium hominis* y las especies de microsporidios *Enterocytozoon bieneusi* y *Encephalitozoon intestinalis*. La diversidad genética encontrada fue baja, particularmente para *E. bieneusi* y *C. hominis*. En el caso de *E. bieneusi*, solo se identificaron 3 genotipos (D-like, D y C) y en *C. hominis* se determinó la

presencia de los subtipos IbA10G2 e IaA11G3T3. A pesar de la baja diversidad, el análisis de la información obtenida a partir de la identificación de estas especies, genotipos y subtipos, sugiere que tanto el hombre como los animales podrían actuar como fuentes de contaminación de las aguas evaluadas.

En el caso de los microsporidios, el estudio de la presencia de estos parásitos en animales domésticos y silvestres de varias regiones de España reflejó su alta frecuencia, confirmando la amplia variedad de hospedadores animales y por ende el gran potencial zoonótico de estos microorganismos. *E. bieneusi* y *E. intestinalis* fueron las principales especies identificadas; observándose además una variedad de genotipos de *E. bieneusi*, frecuentes tanto en humanos como en animales. Estos datos sugieren un papel importante de los animales en el ciclo de transmisión de los microsporidios así como también su participación como agentes contaminantes del ambiente. Estos resultados deben considerarse para el establecimiento de medidas de prevención que contribuyan a reducir la transmisión de estos parásitos, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (pacientes VIH/sida y trasplantados) y personas susceptibles a desarrollar la microsporidiosis, incluyendo la población infantil y los ancianos.

Entre la población inmunocomprometida, los pacientes trasplantados y sometidos a terapia inmunosupresora, se considera como un grupo de alto riesgo para la infección por los microsporidios. En el presente estudio se confirmó, por primera vez en España, la presencia de *E. bieneusi* en dos pacientes trasplantados con sintomatología intestinal. Además, se aportan los primeros datos sobre la caracterización molecular de este microsporidio en humanos, identificándose el genotipo D en ambos aislados. De acuerdo a estos resultados, se sugiere la necesidad de incluir a los microsporidios en el diagnóstico diferencial de diarrea persistente en los pacientes trasplantados así como también en el caso de otros síndromes asociados con estos parásitos, una vez descartadas las causas más comunes.

La variabilidad genética en los microsporidios se ha investigado principalmente en aislados de *E. bienewsi*, *E. cuniculi* y *E. hellem*. Sin embargo, en el caso de *E. intestinalis*, a pesar de ser la segunda especie de microsporidio más frecuente en humanos, hay muy pocos estudios que evalúen su diversidad genética. Mediante la identificación y aplicación de nuevos marcadores con potencial discriminatorio en el análisis de diferentes cepas de este microsporidio, se describe el primer estudio que demuestra una variabilidad genotípica en *E. intestinalis*, estableciendo además marcadores moleculares polimórficos útiles en la clasificación y comparación de aislados de *E. intestinalis*, así como también en la comprensión de aspectos biológicos, epidemiológicos y clínicos de la infección por este microsporidio.

SUMMARY

Cryptosporidium spp., *Cyclospora cayetanensis* and several species of microsporidia are recognized as emerging pathogens of humans. They have resistant life cycles stages that can remain viable for long periods in the environment and particularly in water. Also, in the case of *Cryptosporidium* spp. and microsporidia, several animal reservoirs have been described so far. In recent years, evidence has emerged indicating the pivotal role of water in the transmission of these parasites. In Spain, data about their occurrence in water intended for human use are scarce; and there are a few published data regarding the presence and genetic diversity of these microorganisms in humans and animals. Considering this and to contribute to the knowledge of the molecular epidemiology of microsporidia, *Cryptosporidium* spp. and *Cyclospora* spp. in Spain, we conducted several studies on the presence of these parasites in water from several drinking water treatment plants (DWTP), wastewater treatment plants (WWTP), surface and recreational water from central area of Spain. Microsporidia presence and genetic diversity with classical and new polymorphic genotypic markers was also investigated in clinical samples (both from humans and animals) and several human strains.

Regarding environmental samples, we observed a higher frequency of the parasites evaluated in influent water from wastewater treatment plants and also surface and recreational water. Most of the species identified are pathogenic to humans, including *C. cayetanensis*, *Cryptosporidium hominis*, and the microsporidia *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis*. There was a low genetic diversity in the samples studied, particularly for *E. bieneusi* and *C. hominis*. With respect to *E. bieneusi*, only three genotypes were identified (D-like, D and C), while in *C. hominis*, IaA11G3T3 and IbA10G2 subtypes were determined. Analysis of the information obtained from the identification of these species, genotypes and subtypes, suggests that humans and animals can act as sources of pollution of the water samples evaluated.

In the case of microsporidia, there was a high frequency of these parasites in domestic and wild animals from several regions of Spain; which confirms the wide range of animal hosts and thus the zoonotic potential of these microorganisms. *E. bieneusi* and *E. intestinalis* were the most frequent species identified, and there was also a variety of genotypes of *E. bieneusi*, which are present both in humans and animals. These data suggest an important role of animals in the transmission cycle of microsporidia as well as their role as environmental pollutants. The information provided by this study should be taken into account in establishing appropriate prevention measures to reduce the parasite transmission; especially in immunocompromised patients (HIV/AIDS patients and transplant patients); children and elderly people.

Organ transplant recipients with immunosuppressive therapy are considered a risk group for microsporidiosis. In this investigation, the presence of *E. bieneusi* in two renal transplant recipient patients with intestinal symptoms was confirmed for the first time in Spain. Additionally, data on the molecular characterization of this microsporidia was also provided for the first time in human patients in the country. Genotype D, which is frequent in humans and animals and has a wide geographic distribution, was identified in both isolates. These results suggest that microsporidia should be included in the differential diagnosis of persistent diarrhea in transplant patients as well as for other syndromes associated with these parasites, once the most common causes have been discarded.

Genetic variability on microsporidia has been investigated primarily in *E. bieneusi*, *E. cuniculi* and *E. hellem*. Although *E. intestinalis* is the second most frequent microsporidia species in humans, there are very few studies that evaluate its genetic diversity. We describe the first study that shows a genotypic variability in several human strains of *E. intestinalis*. Additionally, new polymorphic molecular markers were established, which could be useful in the classification and comparison of *E. intestinalis* isolates and, hence in

understanding the epidemiology and the geographical distribution of different strains.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes y estado actual del tema

El agua, el saneamiento y la higiene son factores que tienen consecuencias importantes sobre la salud y la enfermedad. La falta de acceso al agua potable es uno de los problemas más comunes que afectan a las personas en todo el mundo. Además, teniendo en cuenta la escasez de agua que se produce a nivel mundial, incluso en regiones ricas en recursos hídricos, es probable que la gravedad de esta situación aumente en las próximas décadas. La Organización Mundial de la Salud estima que el 24% de la carga de morbilidad mundial y el 23% de todas las defunciones pueden atribuirse a factores ambientales, entre ellos el agua insalubre así como el saneamiento deficiente (Prüss-Üstün y Corvalán 2006). La problemática generada por la falta de agua limpia está bien documentada; 1,2 billones de personas no tienen acceso al agua potable; 2,6 millones no tienen acceso a los servicios de saneamiento básico y millones mueren cada año (3900 niños al día) a causa de enfermedades transmitidas por el agua “no segura” (Malato y col. 2009).

Las enfermedades transmitidas por el agua se producen en todo el mundo, y brotes causados por la contaminación de los sistemas de distribución de agua para el consumo humano tienen el potencial de causar enfermedades en un gran número de personas. Dichos brotes no solo tienen consecuencias económicas derivadas de la morbi-mortalidad y costos de atención médica de los pacientes afectados, sino que también generan una desconfianza en cuanto a la calidad del agua potable y en la industria del agua en general (Karanis y col. 2007). El principal riesgo para la salud humana asociado con el agua lo constituye la transmisión de enfermedades infecciosas a través de esta fuente, lo cual se ve potenciado por la contaminación microbiana derivada de las heces tanto del hombre como de animales (Marshall y col. 1997, Slifko y col. 2000, Gajadhar y Allen 2004).

La mayoría de estas infecciones están causadas por patógenos emergentes o reemergentes, 75% de los cuales son zoonóticos (WHO 2004). Estas enfermedades tienen una distribución mundial y están presentes tanto en

países en desarrollo como desarrollados (Baldursson y Karanis 2011), teniendo un gran impacto en la salud pública. En los últimos años el número de brotes infecciosos asociados con el agua ha aumentado considerablemente, renovando el interés en los microorganismos con potencial de transmisión hídrica, incluyendo virus, bacterias, protozoos y helmintos. En el caso particular de los protozoos, en una revisión realizada por Baldursson y col. (Baldursson y Karanis 2011), se describieron al menos 325 brotes de enfermedades causadas por estos microorganismos y transmitidas por el agua, los cuales se presentaron principalmente en Europa y Estados Unidos, siendo *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp., los agentes más frecuentes. Adicionalmente, otros parásitos emergentes, como *Cyclospora cayetanensis* y los microsporidios, también se asociaron a brotes hídricos (Baldursson y Karanis 2011).

Desafortunadamente, la legislación a nivel mundial y especialmente en España, no tiene en cuenta la búsqueda regular de estos parásitos tanto en aguas potables como residuales y recreacionales, subestimando su presencia en estas fuentes y facilitando su transmisión. En Europa, la reglamentación relacionada con la calidad sanitaria del agua destinada para el consumo humano se basa en la Directiva 98/83/CE, en la cual se estipula que el control microbiológico del agua se debe realizar mediante el seguimiento de bacterias coliformes y *Escherichia coli*. En cuanto a España, los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano se definen en el Real Decreto 140/2003; en el cual solo se contempla la búsqueda de *Cryptosporidium* y otros patógenos en el agua tratada de las Estaciones de Tratamiento de Agua Potable (ETAPs) o en los depósitos de agua. Adicionalmente la detección específica de estos patógenos se debe realizar únicamente cuando los parámetros microbiológicos sean positivos, los niveles de turbidez sean superiores a 5 NTU (Unidad nefelométrica de turbidez) y las autoridades locales lo consideren apropiado. En el caso de los microsporidios y *Cyclospora*, su búsqueda no está contemplada en esta regulación en ningún caso. Con respecto al control de calidad de las aguas recreacionales (Directiva 2006/7/CE del Parlamento Europeo y del Consejo; Real Decreto 1341/2007 del Gobierno español), todos (Directiva

86/278/CEE del Consejo) y aguas depuradas (Real Decreto 1620/2007 del Gobierno español), tampoco se indica la búsqueda de estos parásitos.

A lo anterior debemos agregar que sólo unos pocos países en el continente europeo tienen implementado el seguimiento de parásitos en muestras de agua, específicamente *Cryptosporidium*, incluyendo Inglaterra y Gales (*Drinking Water Inspectorate for England and Wales*) e Irlanda del Norte (*Drinking Water Inspectorate for Northern Ireland*) (Karanis y col. 2007), y a pesar de que Europa tiene establecido un sistema de vigilancia de brotes de infecciones transmitidos por el agua, las actividades de investigación de dichos brotes a menudo son incapaces de identificar las fuentes de infección y los agentes etiológicos, subestimando el potencial de transmisión hídrica de dichos agentes (Baldursson y Karanis 2011).

A pesar de la extensa documentación sobre la transmisión hídrica de parásitos y virus, hasta el momento, el control microbiológico del agua se realiza mediante el seguimiento de indicadores clásicos, como el estudio de los coliformes fecales, ya sea para la determinación de contaminación fecal como también en la evaluación de los procesos utilizados en la eliminación de patógenos. Sin embargo, diferentes estudios han cuestionado la fiabilidad y exactitud de la información aportada por estos indicadores bacterianos (Lipp y col. 2001, Tree y col. 2003, Savichtcheva y Okabe 2006, Girones y col. 2010), describiéndose limitaciones que incluyen: una supervivencia mucho más corta comparada con la de virus y protozoos; una mayor sensibilidad a los tratamientos utilizados para potabilizar el agua; la capacidad de multiplicarse en el ambiente, por lo que la presencia de estas bacterias en el agua no se debe exclusivamente a la contaminación por muestras biológicas incluyendo las heces; y finalmente la baja correlación con la presencia de patógenos (Girones y col. 2010, Botes y col. 2013). Lo anterior sugiere la necesidad de implementar métodos de detección específicos para aquellos patógenos que representan una amenaza para la salud pública y que están estrechamente relacionados con la transmisión hídrica.

En el caso de los parásitos, hasta el momento se cuenta con una metodología estandarizada para la búsqueda de algunos protozoos en muestras de agua. Los protocolos de detección descritos en la literatura generalmente incluyen la recolección y concentración de la muestra, la separación de los parásitos de los detritos contaminantes y la detección de los mismos mediante una variedad de técnicas, como la microscopía, inmunofluorescencia y métodos moleculares (Zarlenga y Trout 2004, Girones y col. 2010). Los métodos de recolección más comúnmente usados incluyen la filtración de grandes volúmenes de agua (10-1000 l), seguido del procesamiento del filtro (lavado) para recuperar el material capturado y la centrifugación del mismo para concentrar la muestra (Rose y col. 2002, Zarlenga y Trout 2004). Debido a que los procesos de concentración se basan casi exclusivamente en el tamaño de las formas parasitarias, una gran cantidad de material extraño también puede quedar concentrado, y este material puede interferir con la detección exitosa de los parásitos, ya sea incrementando el volumen total de material que necesita ser examinado, u obstaculizando la observación de los parásitos durante el análisis de la muestra (Rose y col. 2002, Zarlenga y Trout 2004). Por lo anterior, se han implementado procesos de separación que mejoran la detección de estos microorganismos, incluyendo la centrifugación con gradientes de densidad (sacarosa, Cloruro de sodio, Cloruro de cesio, Sulfato de zinc y percoll®, entre otros) y en el caso específico de *Cryptosporidium* y *Giardia*, la separación inmunomagnética (Rose y col. 2002, Zarlenga y Trout 2004).

Cabe resaltar que hasta el momento, *Cryptosporidium* y *Giardia*, son los únicos parásitos para los que hay descritos protocolos de detección en agua estandarizados y validados en laboratorios tanto de Estados Unidos como del Reino Unido (Girones y col. 2010). El método 1623, que fue desarrollado por la Agencia para la Protección Ambiental de Estados Unidos (Environmental Protection Agency- EPA) para la determinación simultánea de estos dos protozoos, es probablemente uno de los más empleados a nivel mundial (Jiang y col. 2005, Castro-Hermida y col. 2008, Almeida y col. 2010, Almeida y col. 2010, Feng y col. 2011). Este método incluye la recolección y filtración de agua

mediante diferentes equipos de filtrado disponibles comercialmente, incluyendo el sistema IDEXX Filta-Max o la cápsula de muestreo Envirocheck HV (Envirochek™ sampling capsule); la separación inmunomagnética de los parásitos y su identificación y cuantificación mediante inmunofluorescencia. Desafortunadamente, con respecto a la mayoría de parásitos de impacto en la salud pública, incluyendo *C. cayetanensis* y los microsporidios, aún se requieren métodos estandarizados y validados para su búsqueda en muestras de agua, de tal manera que se pueda aportar información valiosa para un adecuado control de calidad de las aguas de uso y consumo humano.

Cryptosporidium spp., *Cyclospora* spp. y varias especies de microsporidios están reconocidos como parásitos emergentes en humanos (Sharma y col. 2003) y hay numerosas evidencias que soportan el potencial de transmisión hídrica de los mismos (Rabold y col. 1994, Cotte y col. 1999). Entre los factores que favorecen la presencia de estos enteroparásitos en el agua, destacan el pequeño tamaño y resistencia de sus formas de diseminación, lo que les permite permanecer viables durante largos periodos de tiempo en el ambiente y escapar de los sistemas más comúnmente empleados en los tratamientos de aguas. Además, en el caso de los microsporidios y *Cryptosporidium* spp., se ha descrito un gran número de reservorios animales, lo que ha facilitado su diseminación por la contaminación ambiental con materias fecales procedentes de dichos reservorios (Fayer 2004, Didier y Weiss 2008).

Debido a este potencial de diseminación, *Cryptosporidium* spp., *C. cayetanensis* y los microsporidios están incluidos en la categoría B de agentes con potencial bioterrorista del NIH (*Nacional Institute of Health*) de Estados Unidos (NIH 2003). Además la EPA, ha incluido a *Cryptosporidium* spp. en la lista de contaminantes de agua (EPA 2009) y a los microsporidios *Enterocytozoon bienensei*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem* y *Vittaforma corneae* en sus dos recientes listas de candidatos contaminantes de agua de consumo (CCL2 Y CCL3) (EPA 2005, 2009).

Todo lo anterior refuerza la necesidad de incluir estos patógenos en las regulaciones para garantizar que el agua cumpla con normas de calidad básicas y por ende la estandarización de métodos útiles en la detección de los mismos en este tipo de muestras.

1.2 Microsporidios

Los microsporidios son un grupo ubicuo de parásitos intracelulares obligados, capaces de infectar un amplio rango de hospedadores vertebrados e invertebrados, y que en la actualidad se encuentran estrechamente relacionados con los hongos (Van de Peer y col. 2000, Keeling y Fast 2002). Aunque están ampliamente distribuidos entre los animales, estos organismos son aparentemente más prevalentes entre los artrópodos y peces, por lo que inicialmente, la mayor parte de la información sobre estos parásitos se derivaba de investigaciones realizadas en estos hospedadores. En 1838, Gluge describió el primer microsporidio en vertebrados, que posteriormente fue denominado *Glugea anomala*, y se asoció con quistes subcutáneos en peces (Franzen 2008). El primer registro de infección por microsporidios en un mamífero se realizó en 1922, año en el que Wright y Craighead identificaron microorganismos gram positivos con un tamaño no mayor de 4 x 1,5 µm en cerebro, medula espinal y riñón de conejos de laboratorio (Franzen 2008). El parásito fue denominado *Encephalitozoon cuniculi* por Levaditi y col. (Franzen 2008), quienes observaron microorganismos similares en el cerebro de conejos con encefalitis granulomatosa. En 1959, Matsubayashi y col. documentaron el primer caso de microsporidiosis en un humano (Franzen y Muller 1999). El paciente era un niño de 9 años que presentaba fiebre recurrente, dolor de cabeza, vomito y convulsiones espásticas. Se observaron esporas del parásito tanto en orina como en líquido cefalorraquídeo (Franzen y Muller 1999), y el microsporidio fue identificado como *Anncaliia (Nosema) connori* (Franzen 2008). Veinticinco años después, un caso similar se describe en un niño colombiano de dos años que vivía en Suecia y que también estuvo asociado con una infección por microsporidios (Franzen y Muller 1999, Franzen 2008). En 1973, Margileth y col. describieron dos casos de infección en córnea asociados con un microsporidio

no identificado. Hasta 1985, menos de 10 casos de microsporidiosis humana se habían documentado; y a partir de este año, con la descripción de la nueva especie, *Enterocytozoon bieneusi*, en un paciente haitiano de 29 años con sida y sintomatología intestinal, hubo un incremento notable en el diagnóstico de pacientes con infección por estos parásitos, los cuales emergieron como agentes causales de infecciones intestinales y sistémicas en pacientes VIH/sida y en personas con otro tipo de inmunocompromiso (Franzen 2008).

Hasta la fecha se han descrito 160 géneros con más de 1300 especies (Keeling 2009, Peyretailade y col. 2011). Nueve de estos géneros (*Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Vittaforma*, *Brachiola*, *Nosema*, *Tubulinosema* y *Microsporidium*) y 14 especies se encuentran asociados a infecciones en humanos, siendo *E. bieneusi* y *E. intestinalis* las más comunes (Didier y Weiss 2006, Choudhary y col. 2011, Moretto y col. 2012). La mayoría de las infecciones se presentan en personas inmunocomprometidas, pacientes VIH/sida y trasplantados sometidos a terapia inmunosupresora; aunque se han descrito casos en personas inmunocompetentes asociados a la diarrea del viajero. Estos parásitos producen una variedad de enfermedades sistémicas y no sistémicas, siendo la diarrea crónica la manifestación clínica más común, aunque también produce infecciones oculares, respiratorias, renales y del sistema nervioso central, entre otras (Franzen y Muller 2001, Didier y Weiss 2006).

1.2.1 Taxonomía y filogenia

Los microsporidios se llevan estudiando más de 150 años, y al igual que muchos eucariotas unicelulares, estos microorganismos tienen una extensa historia de errores en cuanto a su ubicación taxonómica (Figura 1). La primera descripción de un microsporidio se remonta al año 1857, cuando Nägeli denomina *Nosema bombycis* al agente causal de la enfermedad del gusano de seda (*Bombix mori*) conocida como pebrina (Franzen 2008). Nägeli los agrupó dentro de los Schizomycetos, un grupo artificial de hongos que incluía una colección de muchas especies de eucariotas y procariotas no relacionadas entre

sí. Posteriormente, Balbiani en 1882, creó un nuevo grupo denominado "microsporidios", ubicándolos dentro de la clase Sporozoa de los protozoos, y Döflein en 1901 los agrupó dentro de la subclase Cnidosporidia, Orden Myxospora. Esta clasificación se basó en el hecho de que estos microorganismos presentaban un ciclo de vida intracelular obligado, un túbulo polar y la habilidad de formar esporas. Durante más de 70 años, los microsporidios mantuvieron esta taxonomía, hasta que la definición de ciertas características ultraestructurales y bioquímicas de la subclase Cnidosporidia revelaron diferencias fundamentales tanto del túbulo polar como de las esporas entre los subgrupos que conformaban dicho taxón, lo que llevó a que se creara un *Phylum* nuevo para los microsporidios, que se denominó Microspora (Franzen 2008, Keeling 2009).

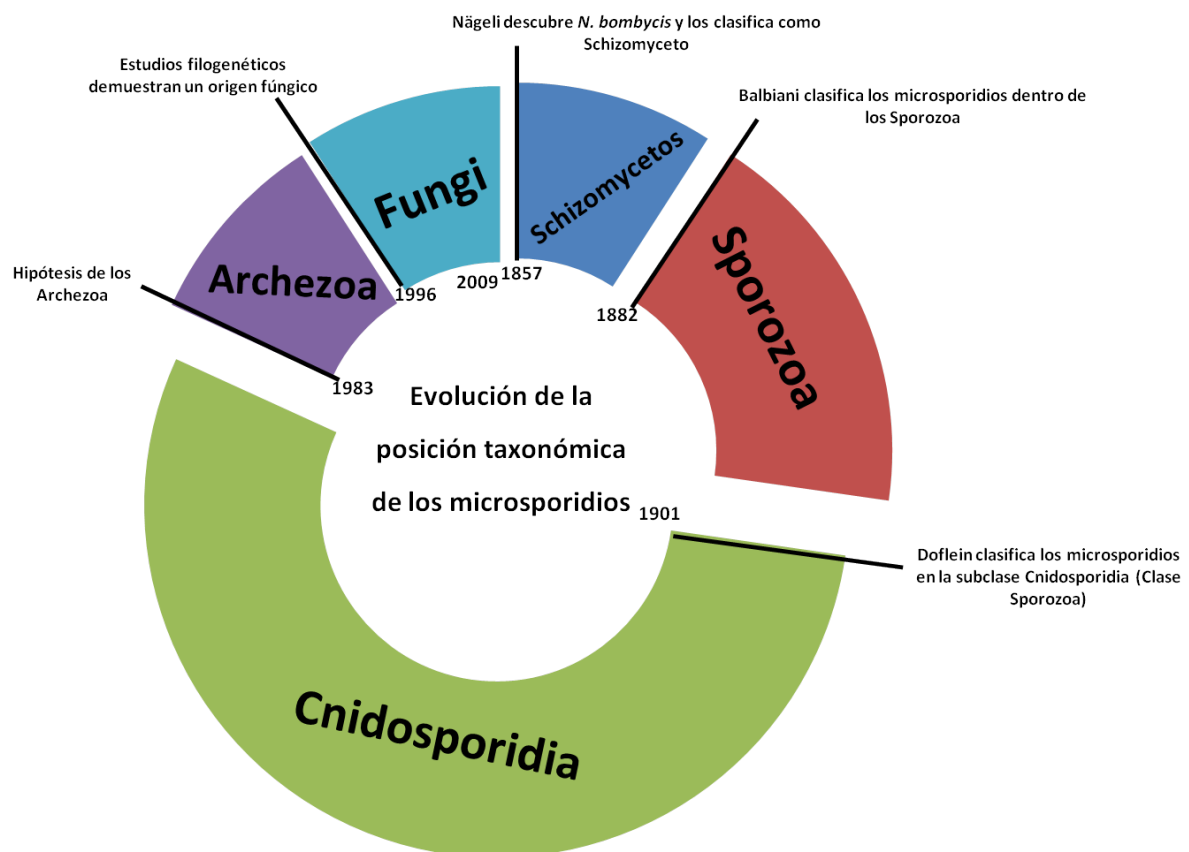


Figura 1. Evolución taxonómica de los microsporidios. [Tomado y traducido de (Keeling 2009)]

En 1983, Cavalier-Smith incluyó a los microsporidios en el subreino Archezoa basado en la ausencia de mitocondrias en dicho grupo. Además estos microorganismos carecían de otras estructuras típicas de los eucariotas, como peroxisomas, aparato de golgi clásico, ribosomas 80 S, flagelos y estructuras de microtubulos 9+2 (Keeling y Fast 2002, Keeling 2009). Teniendo en cuenta estas observaciones, se propuso que los microsporidios y otros protistas sin mitocondria eran posiblemente descendientes de eucariotas primitivos, los cuales evolucionaron antes de la adquisición de la mitocondria por endosimbiosis, y que por lo tanto debían estar en la rama más temprana del árbol evolutivo de los eucariotas (Franzen y Muller 1999, 2001, Keeling y Fast 2002, Mathis y col. 2005). Entre estos microorganismos además del *Phylum* Microspora también se incluyeron los Metamonadina (*Giardia*), Parabasalia (*Trichomonas*) y Archamoebae (*Entamoeba*) (Keeling y McFadden 1998, Keeling 2009).

La formulación de la hipótesis de los Archezoa coincidió con la aplicación de herramientas moleculares en los estudios filogenéticos y sistemáticos microbianos, y en el caso de los microsporidios, dichos análisis reforzaron el concepto de estos microorganismos como eucariotas primitivos. En 1987, la secuenciación y análisis filogenético del ADN de las subunidades grande y pequeña del ARN ribosomal del microsporidio *Vairimorpha necatrix* apoyó esta teoría, ubicando a estos parásitos no solamente en la base del árbol eucariótico, sino también revelando la fusión de la subunidad grande del ARN ribosomal con el ARN ribosomal 5.8S, una característica propia de los procariotas (Keeling y Corradi 2011). Adicionalmente, análisis filogenéticos de nuevos genes, entre los que se incluían los factores de elongación *EF1-α* y *EF-2* y el ARN de transferencia de la isoleucil sintetasa, dieron más peso a la hipótesis de los Archezoa (Keeling y Fast 2002, Keeling y Corradi 2011).

Sin embargo, a pesar de las numerosas evidencias que apoyaban la pertenencia al grupo de los Archezoa, varios autores propusieron que estos parásitos en lugar de ser organismos ancestrales primitivos, podrían ser el producto de un

proceso de reducción de un ancestro mucho más complejo (Keeling y Fast 2002, Keeling y Corradi 2011). De hecho, nuevos estudios apoyaron la teoría de un origen más reciente de los microsporidios y su inclusión en el reino de los hongos. En primer lugar, el análisis del genoma del microsporidio *E. cuniculi* reveló la presencia de genes relacionados con algunas funciones mitocondriales, sugiriendo que los microsporidios tenían un orgánulo derivado de las mitocondrias (Katinka y col. 2001). Williams y col. (Williams y col. 2002), utilizando como modelo el microsporidio *Trachipleistophora hominis*, identificaron la proteína mitocondrial HSP70 mediante anticuerpos, en numerosos y pequeños orgánulos de doble membrana, que fueron denominados mitosomas. Así mismo se demostró que el gen *hsp70* de los microsporidios presentaba una alta similitud con los genes mitocondriales de los hongos, sugiriendo que estos genes fueron transferidos de la mitocondria al genoma de los ancestros de estos parásitos y que este orgánulo se perdió durante la evolución.

De igual manera, el análisis filogenético de las secuencias de los genes de la α - y β -tubulina de los microsporidios *Antonospora (Nosema) locustae*, *Spraguea lophii*, *E. cuniculi* y *E. hellem* también sugirió una posición diferente de los microsporidios, relacionándolos con los hongos (Keeling y Fast 2002). Esto incentivó un nuevo análisis de los datos de secuencias que se tuvieron en cuenta para su previa clasificación, mediante el uso de métodos más eficaces en la corrección de artefactos que pudiesen influir en una reconstrucción filogenética errada, entre los que se destaca el fenómeno de atracción de ramas largas (*long branch attraction*). Dicho fenómeno sucede en secuencias que presentan una tasa de evolución acelerada, por lo que puede inferirse una relación cercana entre ellas, y que en el caso de los microsporidios, es un evento plausible teniendo en cuenta las altas tasas de substitución que se han observado en muchos genes de estos microorganismos (Keeling y Fast 2002). Otros marcadores filogenéticos que establecieron una relación entre los microsporidios y los hongos incluyen los genes de la proteína de unión a la caja

TATA, el ARN de transferencia de la glutamil sintetasa y la subunidad grande de la ARN polimerasa II (*RBP1*) (Keeling y Fast 2002).

Con el fin de definir correctamente esta relación y evitar los errores derivados de las reconstrucciones filogenéticas, otros autores analizaron características moleculares basadas en la organización y estructura genómica tanto de los microsporidios como de ciertas familias de hongos. Lee y col. (Lee y col. 2010) describieron una relación estrecha con los hongos zigomicetos, ya que ambos grupos de microorganismos tenían una arquitectura similar del genoma, con la presencia de múltiples *loci* sinténicos, incluyendo un “*locus* de tipo de apareamiento” (*Mating type locus*), el cual contenía los genes que codificaban para una proteína transportadora de triosafosfato, un grupo proteínas de alta movilidad (High Mobility Group- *HMG*) y una ARN helicasa (Lee y col. 2010). Esta sintenia es única entre los microsporidios y los zigomicetos, y está ausente en otros hongos cuyos genomas están disponibles, incluyendo los chytridiomicetos, ascomicetos y basidiomicetos. Estos hallazgos sustentan la hipótesis de que los microsporidios son verdaderos hongos que descienden de un ancestro de los zigomicetos y que pueden tener un ciclo de vida sexual controlado (Lee y col. 2008, Lee y col. 2010). Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido una relación funcional directa entre este *locus* y la reproducción sexual en los microsporidios (Lee y col. 2008, Lee y col. 2010).

Todo lo anterior sumado a ciertas características que comparten los microsporidios con los hongos, entre las que se encuentran la presencia de quitina y trehalosa, ciertas similitudes en el ciclo de vida y la organización de genes (timidilato sintetasa y dehidrofolato reductasa) (Mathis y col. 2005), permite considerar que estos parásitos son hongos altamente evolucionados, que han sufrido una substancial reducción genómica y funcional, probablemente en respuesta a su adaptación al parasitismo intracelular.

De acuerdo a la clasificación realizada por Adl y col. (Adl y col. 2012), los microsporidios se incluyen en el supergrupo Opisthokonta de los eucariotas,

formando parte de uno de los 9 grupos basales de los hongos (Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Entomophthoromycotina, Glomeromycota, Kick-xellomycotina, Microsporidia, Mucoromycotina, Neocallimastigomycota, Zoopagomycotina). Datos aportados por el "proyecto del árbol de la vida de los hongos" (*Fungal Tree of Life project*) indican además que estos microorganismos forman un clado con el hongo *Rozella* spp., con el que comparten ciertas características (Williams y Keeling 2011).

1.2.2 Morfología

La característica que unifica a todos los miembros del *Phylum* Microsporidia y califica a un microorganismo como microsporidio es que existen solamente como esporas en el exterior de las células y la invasión del hospedador involucra la extrusión de un túbulo polar a través del cual inocula el material infectivo (Bigliardi y Sacchi 2001). Las esporas son ovaladas, gram positivas y resisten largos periodos en el medio ambiente representando el estado maduro e infeccioso de los microsporidios. Las especies que infectan mamíferos miden en promedio 2 a 7 μm por 1,5 a 4 μm . Generalmente el tamaño de las esporas que infectan insectos es mayor, llegando a medir hasta 40 μm (*Bacillidium filiferum*). La espora está rodeada por dos capas extracelulares rígidas y una membrana plasmática interna trilaminar (Figura 2). La capa externa electrodensa, o exospora, está compuesta por una matriz de proteínas con predominio de glicoproteínas y la capa interna electrolúcida o endospora, compuesta por quitina y otras proteínas. La endospora es más gruesa que la exospora, pero es más delgada en la parte apical de la espora. El interior de la espora está compuesto por dos partes con funciones diferentes: el esporoplasma y el aparato de extrusión. El esporoplasma es el material infeccioso de los microsporidios y contiene un núcleo, que puede ser único (*Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Pleistophora*, *Traquipleistophora*) o doble con una única función (*Nosema*, *Brachiola*, *Vittaforma*), ribosomas, retículo endoplasmático y una compleja red de estructuras vesiculares y tubulares que se asemejan al aparato de golgi (Delbac y Polonais 2008).

Si bien los microsporidios presentan características de verdaderos eucariotas, que incluyen la presencia de núcleo, sistema de membranas intracitoplasmático y la separación de los cromosomas por husos mitóticos, también presentan ciertas características propias de los procariotas (Franzen y Muller 1999). Poseen ribosomas 70S y el ARN ribosomal (ARNr) está compuesto por una subunidad pequeña 16S y una subunidad grande 23S, separadas por un único espaciador intergénico no transcrito. Además, contrario a lo que pasa en los eucariotas, los microsporidios carecen de una subunidad de ARNr 5.8S independiente y el tamaño de los genes del ARNr es mucho más pequeño que el encontrado en los eucariotas (Franzen y Muller 1999).

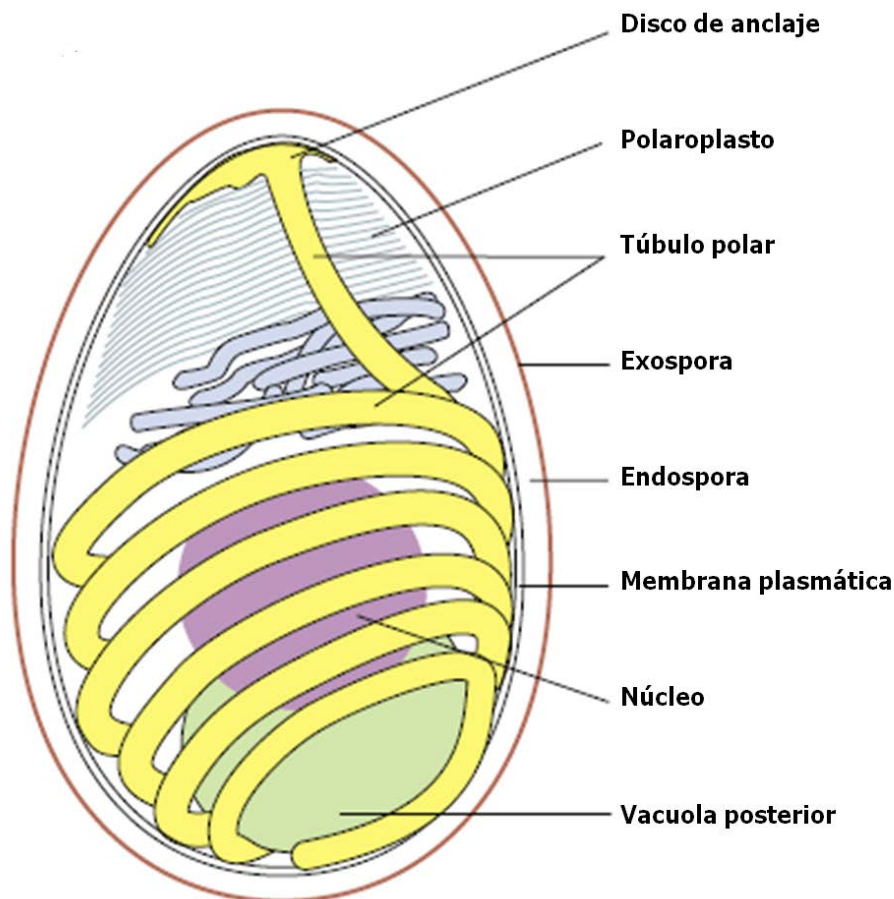


Figura 2. Espora de un microsporidio y sus principales componentes. Tomado y traducido de (Franzen 2004)

El aparato de extrusión es un conjunto de estructuras altamente especializadas que incluyen el túbulo polar (o filamento polar), enrollado alrededor de la parte

posterior de la espora; un disco de anclaje; el polaroplasto y una vacuola posterior. El polaroplasto es una red de membranas ubicada en la parte anterior de la espora. La porción anterior del polaroplasto está organizada en forma de membranas estrechamente apiladas y se denomina polaroplasto lamelar, mientras que la porción posterior está distribuida más libremente en el citoplasma y se le conoce como polaroplasto vesicular. El túbulo polar es una estructura tubular alargada, rodeada por una membrana y varias capas de glicoproteínas, mide entre 0,1 a 0,2 μm de diámetro y 50 a 500 μm de longitud (Keeling y Fast 2002, Delbac y Polonais 2008). Está dividido en 2 regiones: una parte anterior recta, denominada manubrio y que está rodeada por el polaroplasto lamelar y conectada con el disco de anclaje en la parte anterior de la espora; y una parte posterior que da vueltas periféricas dentro del esporoplasma y que termina en la vacuola posterior. Esta parte del túbulo polar parece estar delimitada por una membrana y consiste en varias capas concéntricas electrodensas y electrolúcidas alrededor de un cuerpo central. El número de vueltas y la organización en una o varias filas es un criterio diagnóstico de especie. Aún no está claro si existe una asociación directa entre el túbulo polar y la vacuola posterior (Keeling y Fast 2002).

La vacuola posterior contiene estructuras glomerulares, que pueden observarse solamente en las esporas maduras y que probablemente forman una red de vesículas similares a un aparato de Golgi. Durante la descarga del túbulo polar, se pueden observar remanentes de estas vesículas en forma de estructuras filamentosas o amorfas (posterosoma) (Figura 2) (Bigliardi y Sacchi 2001).

1.2.3 Organización genómica

Los microsporidios tienen un genoma nuclear con un tamaño variable, que va desde los 2,3 Mpb (mega pares de bases) de *E. intestinalis* hasta los ~24 Mpb de *Octospora bayeri* (Peyretailade y col. 2011). Hasta la fecha se han estudiado varios genomas de microsporidios, con diferentes porcentajes de cobertura (Corradi y Slamovits 2011), sin embargo, en la actualidad, solo se ha publicado el genoma completo de 4 especies, *E. cuniculi* (Katinka y col. 2001),

E. intestinalis (Corradi y col. 2010), *E. hellem* y *Encephalitozoon romaleae* (Pombert y col. 2012). Adicionalmente, se están desarrollando proyectos de genoma de otras especies, incluyendo *E. bieneusi* (Keeling y col. 2010); *N. ceranae* (Cornman y col. 2009), *Antonospora (Nosema) locustae* (Didier y Weiss 2008), *Anncaliia algerae* (Peyretailade y col. 2011), *Edhazardia aedis* (Williams y col. 2008) y *O. bayeri* (Corradi y col. 2009), entre otros. Las características genómicas de varias especies de microsporidios se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características genómicas de varias especies de microsporidios

| | <i>E. cuniculi</i> | <i>E. intestinalis</i> | <i>E. hellem</i> | <i>E. bieneusi</i> | <i>N. ceranae</i> | <i>O. bayeri</i> |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Número de cromosomas | 11 | 11 | 11 | ≥6 | Desconocido | Desconocido |
| Tamaño del genoma (Mpb) | 2,9 | 2,3 | 2,5 | 6 | >10 | ≤24,2 |
| Genoma ensamblado (Mpb) | 2,5 | 2,2 | 2,3 | 3,86 | 7,86 | 13,3 |
| Porcentaje de cobertura (%) | 86 | 96 | 92 | 64 | ND | 55 |
| Contenido G+C (%) | 47 | 41,4 | 43,4 | 25 | 26 | 26 |
| Promedio de distancia intergénica (pb) | 119 | 115 | 124 | 127 | ND | 429 |
| Densidad génica (gen/Kpb) | 0,84 | 0,86 | 0,86 | 0,87 | 0,6 | 0,23 |
| Intrones asociados al espliceosoma | 36 | 36 | 36 | 0 | 6 | ≥6 |
| Intrones asociados al ARNt | 2 | 2 | 2 | 2 | ND | ≥1 |
| Número de marcos abiertos de lectura predichos | 1999 | 1833 | 1848 | 3804 | 2614 | 2174 |
| Número de marcos abiertos de lectura con funciones asignadas | 894 (45%) | 886 (48%) | ND | 669 (39%) | ND | 894 (41%) |
| Genes superpuestos | Si | Si | Si | Si | ND | No |
| Referencia bibliográfica | (Katinka y col. 2001, Pombert y col. 2012) | (Corradi y col. 2010) | (Pombert y col. 2012) | (Akiyoshi y col. 2009) | (Cornman y col. 2009) | (Corradi y col. 2009) |

pb: pares de bases; Mpb: mega pares de bases; Kpb: kilo pares de bases; ND: no descrito

El genoma de estos parásitos está organizado en múltiples cromosomas lineales y en general está compuesto predominantemente por genes que codifican proteínas involucradas en funciones básicas (transcripción, traducción, replicación, etc) y proteínas implicadas en la relación parásito-hospedador (infección, transporte de nutrientes, ciclo celular, etc). Se ha demostrado que los genomas más grandes tienden a codificar proteínas que participan en múltiples vías metabólicas (glucólisis y metabolismo de ácidos grasos, entre otras), mientras que en los genomas más pequeños, predominan los genes implicados en la sustracción de metabolitos del hospedador (proteínas transportadoras de ATP, entre otras) (Keeling y Slamovits 2004, Keeling y col. 2005, Corradi y col. 2007, Lee y col. 2010, Corradi y Slamovits 2011, Keeling y Corradi 2011).

La relación entre el microsporidio y su hospedador puede haber inducido la conservación o pérdida de genes específicos de diversas rutas bioquímicas. El parasitismo intracelular obligado ha llevado a los microsporidios a adaptarse a sus hospedadores mediante la reducción en el tamaño de su genoma, hasta el extremo de tener el genoma más pequeño descrito en organismos eucariotas (*E. intestinalis*, 2,3 Mpb) (Corradi y col. 2010). Algunas especies presentan una extrema dependencia de su hospedador, lo que se demuestra por la ausencia y/o reducción en el número de genes que codifican para proteínas de vías metabólicas que están conservadas en otros eucariotas (metabolismo del carbono, ácidos grasos, aminoácidos y síntesis de nucleótidos, entre otras) (Keeling y Slamovits 2004, Keeling y col. 2005, Corradi y col. 2007, Lee y col. 2010, Corradi y Slamovits 2011, Keeling y Corradi 2011).

Esta reducción en el tamaño genómico se ha producido en los microsporidios mediante dos mecanismos básicos: 1- la reducción o pérdida de genes, lo que influye en una menor complejidad proteómica del parásito y 2- la compactación génica (Keeling y Slamovits 2004, Keeling y col. 2005, Corradi y Slamovits 2011, Keeling y Corradi 2011, Peyretailade y col. 2011). La pérdida masiva de genes es una característica que se observa en los microsporidios ya que estos

pueden prescindir de muchos genes cuyas funciones las asume la célula hospedadora; mientras que la compactación de genes es un proceso más complejo que hasta el momento no se ha dilucidado completamente. Los genes que permanecen en el genoma de estos microorganismos se encuentran estrechamente empaquetados, a través de la disminución en el tamaño de los mismos y la reducción significativa o eliminación de las regiones intergénicas, lo que conlleva a un aumento en la densidad génica (Keeling y Slamovits 2004, Keeling y col. 2005, Corradi y Slamovits 2011, Keeling y Corradi 2011, Peyretailade y col. 2011). En los casos extremos dicha densidad llega a ser de cero, resultando en secuencias codificantes que se superponen entre sí (genes superpuestos) (Tabla 1) (Corradi y Slamovits 2011).

Los microsporidios también han encontrado la forma de comprimir el espacio ocupado por los genes mediante la reducción en la longitud de sus propias proteínas e intrones (Corradi y Slamovits 2011, Keeling y Corradi 2011, Peyretailade y col. 2011). El tamaño promedio de las proteínas de estos parásitos alcanza únicamente una tercera parte de las proteínas homólogas en los hongos, y los escasos 36 intrones identificados hasta el momento en los microsporidios (*E. cuniculi*) solo tienen una longitud de 50 pb (Keeling y col. 2005).

Encephalitozoon cuniculi es un claro ejemplo de reducción extrema y compactación del genoma, con un potencial codificante muy bajo, ya que sólo se han identificado 1999 genes codificantes de proteínas (Katinka y col. 2001, Corradi y col. 2007, Corradi y Slamovits 2011). La distribución de dichos genes en categorías funcionales indica que la pérdida de genes en los microsporidios no es un fenómeno aleatorio, ya que como se ha mencionado anteriormente, se ha observado la ausencia total o parcial de genes que codifican para proteínas de determinadas vías metabólicas o reguladoras (Corradi y Slamovits 2011, Peyretailade y col. 2011). Se ha demostrado la ausencia de genes que codifican proteínas involucradas en la biosíntesis de moléculas pequeñas incluyendo nucleótidos, ácidos grasos y la mayoría de los aminoácidos. Por el

contrario, se han identificado la mayoría de los genes que participan en procesos esenciales como la replicación y transcripción del ADN, síntesis de proteínas y glicolisis, entre otros (Katinka y col. 2001). Adicionalmente, se ha observado un aumento en la expresión de genes codificadores de proteínas transportadoras de fuentes de energía (glucosa y ATP) como también de otros metabolitos (nucleósidos y aminoácidos) y de iones (Corradi y col. 2010, Corradi y Slamovits 2011, Peyretailade y col. 2011).

En términos de compactación, el genoma de *E. cuniculi* tiene cromosomas compuestos por regiones centrales ricas en genes que están flanqueadas en ambos extremos por operones de ARN ribosomal, regiones subteloméricas no codificantes y telómeros (Katinka y col. 2001). Estas regiones centrales tienen una alta densidad génica (0,97 genes/Kpb), con segmentos intergénicos cortos (un promedio de 129 pb), pocos intrones y genes más cortos (15%) que sus homólogos en las levaduras.

Encephalitozoon intestinalis es otro modelo de reducción y compactación genómica; tiene hasta un 20% de reducción con respecto al tamaño del genoma de *E. cuniculi* y únicamente 1833 genes codificantes (Corradi y col. 2010, Corradi y Slamovits 2011) (Tabla 1). La comparación entre estas dos especies indica una conservación en cuanto al contenido, orden y densidad de genes en los 11 cromosomas en los que está distribuido el genoma. De hecho, se ha observado que las regiones intergénicas y los intrones están muy conservados a nivel de secuencia y contrario de lo que se espera de un genoma eucariótico, se caracterizan por tener una tasa de evolución mucho menor comparada con la observada en las regiones codificantes (Corradi y col. 2010).

En cuanto a las diferencias entre las dos especies, parece ser que estas se dan en las grandes regiones subteloméricas encontradas en la mayoría de los cromosomas de *E. cuniculi* (Dia y col. 2007) y extremadamente reducidas en *E. intestinalis*. La pérdida masiva de genes en *E. intestinalis* no ha tenido un impacto en la supervivencia del parásito, ya que la mayoría de los genes

ausentes son proteínas hipotéticas o duplicado de genes ya existentes (Corradi y col. 2010). Únicamente 15 genes codificantes de proteínas con funciones conocidas, que se identificaron en *E. cuniculi*, no se encontraron en *E. intestinalis*; mientras que solo 4 genes se hallaron en *E. intestinalis* pero no en *E. cuniculi*. Todo lo anterior sugiere que las regiones centrales de estos cromosomas han llegado a un límite de reducción y es poco probable que cambios sustanciales puedan darse en estos segmentos genómicos (Corradi y col. 2010).

Con respecto a *E. hellem*, los datos revelados por el estudio de su genoma indican que este es similar al genoma de *E. cuniculi* y *E. intestinalis*, tanto en forma como en contenido (Pombert y col. 2012). Sin embargo, *E. hellem* posee ciertos genes que no se encuentran o están en un número reducido en otros microsporidios, con la excepción de *E. romaleae*. Todos estos genes están relacionados con el metabolismo del folato y las purinas, y parece que se han originado a partir de eventos independientes de transferencia horizontal de genes, de diferentes donadores eucariotas y procariotas, sugiriendo la existencia de un ancestro común entre ambas especies de microsporidios (Pombert y col. 2012).

El genoma de *E. bieneusi* es de mayor tamaño que las especies del género *Encephalitozoon*, por lo que el grado de compactación es menor (0,7 genes por Kb); sin embargo, presenta una mayor dependencia de su célula hospedadora (Corradi y col. 2007). Diversos estudios han demostrado la ausencia total de los genes esenciales para el metabolismo del carbono, particularmente los implicados en la vía de la pentosa fosfato y trehalosa, y la presencia de únicamente dos genes que codifican para proteínas que participan en la glucólisis (Keeling y col. 2010). Lo anterior implica que *E. bieneusi* no tiene un mecanismo propio para producir energía y que por lo tanto, depende completamente del hospedador para la obtención de la misma. Este grado de dependencia es único entre los eucariotas y puede ser la causa de la resistencia del parásito frente a los tratamientos convencionales antifúngicos y su

incapacidad de crecer *in vitro* durante largos periodos. Se ha sugerido que el fenómeno de duplicación de genes puede estar asociado al mayor número de genes descritos en este microsporidio (Akiyoshi y col. 2009).

Cabe resaltar que los genomas altamente compactados no son una característica universal entre los microsporidios. Diversas especies tienen genomas grandes que contienen genes más grandes y más ampliamente espaciados; algunos de ellos con secuencias repetidas y/o numerosos elementos móviles (Williams y col. 2008, Akiyoshi y col. 2009, Corradi y col. 2009).

Finalmente, una característica interesante en el genoma de los microsporidios, es que pese a que estos han evolucionado rápidamente a nivel de secuencia, presentan un alto grado de sintenia (conservación en el orden de los genes), aún en especies filogenéticamente distantes. Análisis comparativos de regiones pequeñas de *O. bayeri* y *E. cuniculi* (Corradi y col. 2009), segmentos grandes de *A. locustae*, *E. bieneusi* y *E. cuniculi* (Slamovits y col. 2004, Corradi y col. 2007) o ciertos genes como los que codifican para las proteínas del túbulo polar (Delbac y Polonais 2008) han puesto de manifiesto esta característica.

1.2.4 Diversidad genética de los principales microsporidios patógenos para humanos

La detección y diferenciación de genotipos dentro de las especies de microsporidios ha sido importante para el esclarecimiento de sus reservorios y modos de transmisión. Mediante la combinación de estudios epidemiológicos y las técnicas de genotipado, se ha logrado un mejor entendimiento del comportamiento de estos parásitos (Matos y col. 2012). Antes de la introducción de las técnicas moleculares, la caracterización de los microsporidios se realizaba mediante la observación de diferencias morfológicas de las esporas y/o estadios de desarrollo por microscopía electrónica, y también la identificación del rango de hospedadores de cada especie (Mathis y col. 2005). Con la reciente aplicación de métodos moleculares basados en la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tanto para la identificación específica de especie como para la diferenciación de genotipos, se ha incrementado la información disponible sobre la diversidad genética de los microsporidios. Sin embargo, aún es necesaria la búsqueda de nuevos blancos genómicos que puedan facilitar la identificación de genotipos, especialmente en aquellas especies con regiones intergenicas e intrones pequeños.

1.2.4.1 *Enterocytozoon bieneusi*

Enterocytozoon bieneusi es una especie compleja, caracterizada por presentar una gran diversidad genética, un amplio rango de hospedadores y una patogenicidad variable (Matos y col. 2012). Durante décadas, el análisis de la secuencia del espaciador transcrito interno (Internal transcribed spacer-ITS) del gen del ARN ribosomal, se ha usado ampliamente en el estudio de la epidemiología molecular de esta especie (Thellier y Breton 2008, Santin y Fayer 2009, Henriques-Gil y col. 2010, Santin y Fayer 2011, Matos y col. 2012). Dicha región mide aproximadamente 243 pb y se caracteriza por ser una secuencia que ha mostrado una gran variabilidad entre diferentes aislados de este microsporidio. Hasta la fecha, mediante el análisis de este marcador, se han identificado más de 100 genotipos de *E. bieneusi*, tanto en humanos como en animales (Widmer y Akiyoshi 2010). Sin embargo, la terminología utilizada en la asignación de los nombres de estos genotipos es muy diversa, dependiendo del grupo investigador que haya analizado cada aislado. La ausencia de una nomenclatura apropiada para las variantes de las secuencias de la región ITS ha resultado en múltiples designaciones para los mismos genotipos (Santin y Fayer 2009), algunos de los cuales han recibido hasta 6 nombres diferentes. Esto ha generado una redundancia en la cantidad de genotipos descritos en la literatura y ha hecho difícil y confusa la comparación de los datos genotípicos de *E. bieneusi* publicados a nivel mundial.

Debido a lo anterior, y con el fin de facilitar las investigaciones sobre la epidemiología y patogenicidad de este microsporidio, Santin y Fayer (Santin y Fayer 2009), analizaron y tabularon todos los sinónimos de los genotipos

existentes, y propusieron un sistema de nomenclatura estandarizado para dichos genotipos. De acuerdo a estos autores, el primer nombre publicado para un determinado genotipo, debería ser el nombre utilizado en todas las investigaciones que se realicen en el futuro y en las que se obtenga información mediante el análisis de la región ITS. Los nombres de nuevos aislados se dejan a discreción de los autores y deben tener un número de *GenBank* asignado. En este estudio se identificaron un total de 81 genotipos, 26 de los cuales se encontraron exclusivamente en humanos; 8 en humanos y otros hospedadores; 27 en ganado y cerdos; 6 en gatos y perros y 14 en varios hospedadores (Santin y Fayer 2009). A partir de estos datos, los autores establecieron dos grupos principales de genotipos; en un primer grupo, incluyeron un gran número de genotipos que no presentan especificidad de hospedador y que se encuentran tanto en humanos como en animales, por lo que se consideraron como zoonóticos. En el segundo grupo se encuentra un número menor de genotipos que se asocian de manera específica a ciertos hospedadores animales.

Recientemente, dos grupos de investigadores realizaron el análisis de las secuencias del ITS de *E. bieneusi* publicadas en *GenBank* mediante métodos estadísticos, con el fin de obtener información con respecto a la diversidad, transmisión y evolución de esta especie (Henriques-Gil y col. 2010, Widmer y Akiyoshi 2010). Estos estudios, corroboraron los hallazgos de Santin y Fayer (Santin y Fayer 2009), al identificar varios grupos de genotipos de *E. bieneusi* adaptados a una gran variedad de animales domésticos y silvestres; como también un grupo numeroso de genotipos que no presentaban especificidad de hospedador y que correspondían a los genotipos con potencial zoonótico. A partir del análisis de 179 secuencias de la región ITS de *E. bieneusi*, publicadas en *GenBank*, Henriques-Gil y col. (Henriques-Gil y col. 2010) identificaron 4 grupos de genotipos claramente divergentes entre sí. El Grupo I contiene el 94% de las secuencias (168) y exhibe una alta diversidad, principalmente debido a polimorfismos de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphisms-*SNP*), y con menor frecuencia a inserciones o deleciones de

pocos pares de bases. Las secuencias de este grupo se clasificaron en 84 haplotipos diferentes, que coinciden con los grupos establecidos por Santin y Fayer, con la excepción de 3 secuencias. Los otros grupos, que están claramente segregados del grupo I, incluyen pocas secuencias (3 en el grupo II y III; 5 en el grupo IV) y se han encontrado en un rango mucho más reducido de hospedadores (Henriques-Gil y col. 2010).

A pesar de la gran diversidad genética observada en *E. bieneusi* a partir de los análisis de la región ITS, aún se hace necesaria la búsqueda de marcadores adicionales que puedan esclarecer la estructura genética de las poblaciones de este parásito. La discriminación entre cepas de *E. bieneusi* es muy importante, no solamente para la identificación de reservorios y modos de transmisión, sino también para ayudar a explicar las variaciones en patogenicidad características de este parásito y que no se han dilucidado con el estudio de un solo *locus* (ITS). Feng y col. (Feng y col. 2011) mediante el análisis de los datos de secuencia publicados en las investigaciones del genoma de *E. bieneusi* (aislado H348), realizaron la búsqueda de minisatelites y microsatelites, e identificaron 4 marcadores polimórficos (MS1, MS3, MS4 y MS7) útiles en el estudio de la diversidad de este microsporidio. Estos autores, mediante la aplicación de dichos marcadores, desarrollaron una técnica de genotipado con análisis de secuencia de múltiples *locus* (Multilocus Sequence Typing-*MLST*), que demostró tener un gran poder de resolución y cuyo análisis filogenético generó una relación genética similar a la del *locus* de la región ITS, con la formación de los dos grupos de genotipos descritos para *E. bieneusi* (específico de hospedador y zoonótico) (Li y col. 2012).

Pese a todo lo anterior, la epidemiología de *E. bieneusi* aún no está dilucidada. Los datos disponibles subrayan la necesidad de más estudios moleculares que combinen fuentes humanas, de animales y ambientales para entender mejor la relación entre la diversidad genética, especificidad de hospedador y patogenicidad de este parásito.

1.2.4.2 *Encephalitozoon cuniculi*

Las técnicas moleculares han confirmado la existencia de diferentes genotipos de *E. cuniculi*. Didier y col. (Didier y col. 1995) fueron los primeros en demostrar diferencias en la región espaciadora intergénica de 8 aislados de *E. cuniculi*, procedentes de ratones, conejos y perros. Aunque en este microsporidio, la ITS (45 pb) es mucho más corta que la de *E. bienensis*, se ha logrado identificar una variabilidad en dicha región. Basados en la determinación del número de repeticiones del tetranucleótido 5'GTTT3', se han descrito 4 genotipos del parásito (I, II, III y IV) (Didier y col. 1995, Talabani y col. 2010) (Tabla 2). El genotipo I (3 repeticiones) se ha aislado en conejos y humanos; el genotipo II (2 repeticiones) se ha identificado en ratones, ratas y zorros; el genotipo III (4 repeticiones) está asociado a infecciones en perros y humanos (Didier y col. 1995, Mathis y col. 2005) y el genotipo IV (5 repeticiones) se ha publicado recientemente en humanos (Talabani y col. 2010).

Otros marcadores utilizados en el estudio de la variabilidad de *E. cuniculi* incluyen los genes que codifican para la proteína del túbulo polar (Polar Tube Protein-*PTP*) y de la proteína de la pared de la espora-1 (Spore Wall Protein-*SWP1*) (Xiao y col. 2001, Xiao y col. 2001, Asakura y col. 2006). Mediante el análisis de las secuencias de regiones específicas de ambos genes se han podido establecer 3 genotipos de *E. cuniculi*, que coinciden con los basados en la región ITS (Tabla 2). En el caso de la PTP, la longitud del polimorfismo permite identificar el genotipo del parásito mediante una electroforesis del producto de PCR, ya que los genotipos encontrados en humanos tienen amplicones de diferente tamaño (363 pb para el genotipo I y 285 pb para el genotipo III). Adicionalmente los genotipos I y II, que tienen un amplicón del mismo tamaño, pueden diferenciarse mediante un análisis de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (Restriction fragment length polymorphism-*RFLP*), evitando la necesidad de secuenciar el ADN (Xiao y col. 2001). El marcador de la SWP1 tiene una mayor capacidad de resolución, ya

que los 3 genotipos descritos anteriormente se pueden dividir en varios subgenotipos (Xiao y col. 2001) (Tabla 2).

Tabla 2. Marcadores moleculares y genotipos descritos en *E. cuniculi*

| Cepa (Hospedador) | Marcador | | | | | |
|----------------------|-------------------|----------|------------------|----------|-------------------------|----------|
| | ITS | | PTP | | SWP1 | |
| | GTTT ^a | Genotipo | Amplicon (pb) | Genotipo | Amplicon (pb) | Genotipo |
| I (Conejo) | 3 | I | 363 | I | 399 | Ia |
| | | | | | 450 | Ib |
| II (ratón) | 2 | II | 363 | II | 363 ^b 414 | II |
| III (perro) | 4 | III | 285 | III | 348 ^b 429 | IIIa |
| | | | | | 429 | IIIb |
| IV (hombre) | 5 | IV | NE | | NE | |

^a Número de repeticiones de GTTT. ^b Producto de PCR con dos bandas de diferente tamaño en la electroforesis en gel de agarosa. NE: marcador no incluido en este estudio.

1.2.4.3 *Encephalitozoon hellem*

Similar a lo descrito en *E. cuniculi*, para *E. hellem* se han definido diferentes genotipos basados en el estudio de la variabilidad en la región de la ITS. Mathis y col. en 1999 (Mathis y col. 1999), identificaron 3 genotipos de *E. hellem* que diferían en pequeñas inserciones o deleciones, además de ciertas mutaciones puntuales (Table 3). El genotipo 1 correspondía a la mayoría de los aislados caracterizados hasta la fecha, incluyendo muestras de pacientes procedentes de Estados Unidos y Europa; como también aves de Estados Unidos e Indonesia. Los genotipos 2 y 3, se encontraron en un número reducido de aislados de pacientes de Europa y África (Mathis y col. 2005). Estos autores también analizaron los perfiles antigénicos de los diferentes aislados y no encontraron correspondencia entre estos y los genotipos identificados mediante la secuencia de la región ITS, lo que sugirió, que la variabilidad genética de esta especie

debía ser mayor. De acuerdo a lo anterior, se han investigado nuevos marcadores moleculares y aislados de este parásito con el fin de dilucidar su diversidad genética. Xiao y col. (Xiao y col. 2001) establecieron 6 genotipos (1A, 1B, 1C, 2A, 2B y 2C) derivados de aislados humanos mediante un análisis de múltiples *locus*, que incluían el gen de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (*SSU rRNA*) y su región ITS y el gen de la PTP. Este análisis condujo a la definición de nuevos genotipos dentro de los establecidos por Mathis y col.; el genotipo 1 de Mathis y col. tiene una región ITS idéntica a la de los genotipos 1A, 1B y 1C y una secuencia de la *SSU rRNA* idéntica a la de los genotipos 1A y 1B. Los genotipos 2A y 2B, presentan secuencias similares con el genotipo 2, mientras que el genotipo 2C, es idéntico al genotipo 3 (Mathis y col. 1999, Xiao y col. 2001).

Posteriormente, Haro y col. (Haro y col. 2003) describieron dos nuevos marcadores para el genotipado de *E. hellem*, detectando polimorfismos en dos espaciadores intergénicos, denominados IGS-TH e IGS-HZ. La adición de estos marcadores permitió identificar nuevas variantes, confirmando así, la gran variabilidad existente en *E. hellem*. Los diferentes aislados estudiados, se ajustaron al genotipo 1A descrito por Xiao y col., y además se identificó un nuevo genotipo, el 2D, considerado una variante del genotipo 2A. Estos autores, además, identificaron una quinta variedad en el marcador de la PTP, al que denominaron 2C (Haro y col. 2003). De acuerdo a lo anterior, el análisis conjunto de múltiples marcadores y de diferentes aislados ha permitido confirmar la gran variabilidad genética de *E. hellem*, y dependiendo de los marcadores moleculares utilizados se pueden encontrar hasta 9 genotipos de este parásito. En la tabla 3 se describen los marcadores moleculares utilizados en el estudio de la variabilidad genética de *E. hellem* y sus correspondientes genotipos.

Tabla 3. Marcadores moleculares y genotipos descritos en *E. hellem*

| Marcador | Genotipos | | |
|-----------------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | Mathis y col. (Mathis y col. 1999) | Xiao y col. (Xiao y col. 2001) | Haro y col. (Haro y col. 2003) |
| ITS | 1 | 1A, 1B, 1C | 1A |
| | 2 | 2A | NI |
| | | NI | 2D |
| | 3 | 2C | NI |
| <i>SSU rRNA</i> | 1 | 1A, 1B | NE |
| | 2 | 2A, 2B | |
| | 3 | 2C | |
| PTP | NE | 1A | 1A |
| | | 1B | 1B |
| | | 1C | 1C |
| | | 2B | NI |
| | | NI | 2C |
| IGS-HZ | 1 | 1A | 1 |
| | | | 2 |
| | 3 | 2C | 3 |
| IGS-TH | 1 | 1A | 1 |
| | | 1B, 1C | 2 |
| | 3 | 2C | 3 |

NI: genotipo no identificado en los aislados incluidos en este estudio. NE: Marcador no incluido en este estudio.

1.2.4.4 *Encephalitozoon intestinalis*

A diferencia de la situación descrita para las otras especies del género *Encephalitozoon* y *E. bieneusi*, para los que se han identificado varios genotipos con diferencias en cuanto a su biología y epidemiología; *E. intestinalis* parece ser una especie muy homogénea y hasta la fecha no se ha descrito una diversidad genética en este microsporidio. Adicionalmente, los estudios que han evaluado la variabilidad en esta especie son escasos, y la mayoría de estos se han basado únicamente en el análisis de la región ITS y del gen de la PTP, en un número reducido de aislados (del Aguila y col. 1998, Sobottka y col. 1999, Liguory y col. 2000, Xiao y col. 2001). Lo anterior resalta la importancia de buscar nuevos marcadores genéticos que puedan definir si en realidad existe o no polimorfismo en *E. intestinalis*, y con los que se puedan establecer correlaciones hipotéticas con aspectos de la biología (infectividad, síntomas asociados y resistencia a drogas) y epidemiología de este parásito.

1.2.5 Ciclo de vida

Dependiendo del género y/o especie, los microsporidios pueden tener ciclos de vida simples que requieren un solo hospedador (microsporidios que infectan mamíferos) ó ciclos complejos que involucran más de un hospedador y varias generaciones de parásitos con diferentes morfologías (Franzen 2004, 2008). Sin embargo, en todos, el ciclo de vida se desarrolla en tres fases: infectiva o de invasión, proliferativa o merogonia y de maduración o esporogonia (Keeling y Fast 2002).

1.2.5.1 Fase de infección

Para invadir las células hospedadoras, los microsporidios han desarrollado un proceso específico, que *in vitro* puede durar menos de 2 segundos y que involucra la activación de la espora, extrusión del túbulo polar e inyección del esporoplasma infectivo en el citoplasma de la célula blanco a través del túbulo polar (Bigliardi y Sacchi 2001, Franzen 2004, Delbac y Polonais 2008). La estrategia de invasión usada por los microsporidios involucra la germinación de la espora, que se caracteriza por una serie de eventos intracelulares que conllevan a la alteración del esporoplasma y reestructuración de la topología del sistema de membranas del mismo. Este proceso se conoce poco y parece estar promovido por una gran diversidad de estímulos que varían dependiendo de la especie.

Independiente del estímulo, la germinación de la espora implica un aumento de la presión osmótica y por consiguiente un aumento del tamaño de la vacuola posterior y del polaroplasto, que induce a su vez la descarga del esporoplasma a través del túbulo polar. Entre las hipótesis que se han postulado para explicar el aumento en la presión osmótica se encuentran: el aumento en la concentración de ciertas moléculas dentro de la espora, como la trehalosa, un disacárido abundante en el citoplasma de ciertas especies de microsporidios; el incremento en la permeabilidad al agua y el aumento en el influjo y concentración de iones en el interior de la espora (Undeen y Vander Meer 1999). La hidrólisis de trehalosa produce un incremento en el número de

moléculas solubles dentro de la espora, lo que aumenta la osmolaridad e induce la entrada de grandes cantidades de agua. Sin embargo, este fenómeno no es común en todos los microsporidios, lo que se debe probablemente a que solo en algunas especies, la trehalosa es el carbohidrato predominante en el citoplasma de sus esporas (Undeen y Vander Meer 1999, Metenier y Vivares 2001).

Otros autores han descrito que el aumento en las concentraciones de los iones de Ca es un fenómeno asociado con la germinación de la espora. Estos iones pueden liberarse en el esporoplasma durante la degradación del sistema de endomembranas de la espora, permitiendo el influjo de agua, e incluso activando enzimas como la trehalasa, lo que asegura el choque hipertónico en la espora (Keeling y Fast 2002). Se ha postulado también que la interacción del Ca con el citoesqueleto de la espora está relacionado con la activación y descarga de la espora, ya que el tratamiento con inhibidores de la polimerización de microtubulos como la citocalasina D o bloqueadores de la entrada de Ca, como la nifedipina, inhiben dichos procesos (Keeling y Fast 2002).

La activación de la espora y extrusión del túbulo polar también puede inducirse por la adherencia de la misma a la superficie de las células hospedadoras, mediante la unión a los glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) presentes en la mayoría de las membranas de dichas células (Hayman y col. 2005). Sin embargo, los ligandos de la espora involucrados en la interacción con los GAGs de la célula hospedadora aún no han podido determinarse.

Una vez se activa la espora, sigue el proceso de extrusión del túbulo polar y descarga del esporoplasma, que se produce desde la parte anterior y más delgada de la espora, con la expulsión del disco de anclaje y formación de una estructura en forma de collar que sostiene el túbulo polar durante la extrusión. El túbulo polar everte (proceso que se asemeja a un tubo interno deslizándose a través de un tubo externo) y la longitud del mismo se incrementa mediante la

polimerización de las proteínas del túbulo polar (PTPs) durante el proceso (Delbac y Polonais 2008). Cuando el túbulo está completamente extruido, el esporoplasma, incluyendo el núcleo fluye a través del tubo vacío y aparece al cabo de 15-500 milisegundos, como una gota en la parte final del túbulo. La nueva membrana plasmática que rodea al esporoplasma liberado en la célula hospedadora es sintetizada por el polaroplasto lamelar.

El mecanismo por el que el túbulo polar penetra la célula aún no está claro. Inicialmente se pensaba que el túbulo actuaba como una aguja hipodérmica que perforaba la membrana de la célula hospedadora, inyectando el esporoplasma en el citoplasma de la misma. Sin embargo, también existen evidencias que sugieren que la captación de la espora se puede producir por fagocitos profesionales y no profesionales mediante un proceso dependiente de la actina (Delbac y Polonais 2008). La entrada de las esporas (*E. intestinalis*) en fagocitos no profesionales (células Caco-2) involucra la interacción específica entre la parte posterior de la espora y la membrana de la célula hospedadora, con la posterior extrusión del túbulo polar e inducción de la fagocitosis del esporoplasma dentro de una vacuola derivada de la membrana del hospedador (Foucault y Drancourt 2000). En el caso de los fagocitos profesionales, otros estudios sugieren que el proceso fagocítico ocurre en contacto con la parte apical de la espora y la membrana de la célula hospedadora (Franzen 2008). Las esporas internalizadas podrían evadir la respuesta de la célula ya sea impidiendo la unión fagolisosoma ó escapando del compartimento lisosomal por extrusión del túbulo polar y descarga del esporoplasma en el citoplasma de la célula blanco (Franzen 2004, 2008). Sin embargo aún no existe evidencia de una endocitosis mediada por receptores y es posible que la extensión del túbulo polar sea una adaptación que le permita a las esporas no móviles interactuar con células blanco distantes.

Pueden ocurrir infecciones secundarias cuando las esporas maduras que se producen en una célula hospedadora infectada, germinan, infectando ya sea la misma célula o una célula adyacente. Las infecciones pueden diseminarse

cuando el túbulo polar inyecta el esporoplasma en otros tejidos. Otros modelos de invasión que se han postulado se muestran en la Figura 3.

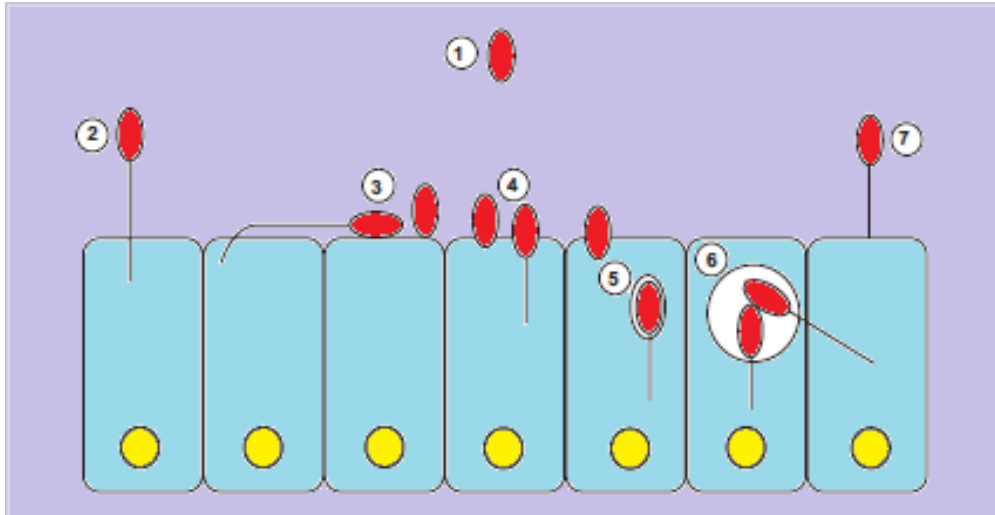


Figura 3. Diferentes mecanismos de invasión de la célula hospedadora por esporas de microsporidios. 1- Espora libre. 2- Perforación de la célula hospedadora por el túbulo polar e inyección del esporoplasma en el citoplasma de la célula hospedadora. 3- Interacción entre la espora del microsporidio y la membrana celular de la célula hospedadora, extrusión del túbulo polar y fagocitosis inducida del esporoplasma dentro de una vacuola derivada de la membrana hospedadora. 4- Perforación de la membrana de la célula hospedadora por el túbulo polar extruido, inyección del esporoplasma en la célula después de la interacción entre la espora y la membrana celular e iniciación de la endocitosis de la espora. 5- Fagocitosis de la espora y escape del esporoplasma del fagolisosoma maduro mediante descarga del túbulo polar. 6- Infección secundaria, ya sea en una vacuola parasitofora (en el caso de *Encephalitozoon* spp.) o desde el citoplasma, de la misma célula o una célula adyacente a través del túbulo polar. 7- Fagocitosis del túbulo polar previamente extruido. [Tomado y modificado de (Franzen 2008)].

1.2.5.2 Fase proliferativa o merogonia

Una vez dentro de la célula, el esporoplasma liberado a través del túbulo polar inicia la fase proliferativa de desarrollo denominada merogonia. En células blanco apropiadas el esporoplasma se transforma en merontes, los cuales son células simples redondeadas o elongadas e irregulares, con un citoplasma poco diferenciado, delimitado por una membrana plasmática y sin retículo endoplasmático o con vestigios de él (Franzen y Muller 1999, Didier y col. 2000, Bigliardi y Sacchi 2001, Franzen y Muller 2001, Keeling y Fast 2002). Los merontes pueden tener núcleos simples o dobles. Cada tipo nuclear puede

tener a su vez varios tipos de división celular. Algunos ciclos tienen células que se dividen por fisión binaria inmediatamente después de la cariocinesis (*Brachiola*). En otros ciclos se forman células multinucleadas y elongadas que se dividen por múltiples fisiones binarias (*Encephalitozoon*, *Nosema*, *Vittaforma*) y en un tercer tipo de división se pueden desarrollar células multinucleadas, redondas y plasmodiales, que se dividen por plasmotomía (*Enterocytozoon*, *Endoreticulatus*). En cualquiera de los 3 tipos, las células pueden repetir varias veces los ciclos de división durante la fase proliferativa o de merogonia (Franzen y Muller 1999, Didier y col. 2000, Bigliardi y Sacchi 2001, Franzen y Muller 2001, Keeling y Fast 2002).

1.2.5.3 Fase de Maduración o esporogonia

Durante la esporogonia los merontes maduran a esporontes, los cuales se caracterizan por presentar una cubierta densa, la cual se convertirá en la exospora de la pared del parásito. Al igual que en los merontes, el núcleo de los esporontes puede ser único o doble. Los esporontes se multiplican por fisión binaria o múltiple y se transforman en esporoblastos que finalmente se desarrollarán en esporas maduras resistentes a las condiciones medioambientales (Franzen y Muller 1999, Bigliardi y Sacchi 2001, Keeling y Fast 2002).

Durante el desarrollo intracelular del ciclo de vida de los microsporidios (merogonia y esporogonia), estos parásitos pueden estar en contacto directo con el citoplasma de la célula hospedadora o presentar diferentes tipos de interfase con el citoplasma hospedador. Se han descrito 4 tipos de interfases entre las esporas de microsporidios y las células hospedadoras (Franzen 2008). En el tipo I se incluyen las especies que se desarrollan en contacto directo con el citoplasma de la célula hospedadora (*Nosema* y *Enterocytozoon*). El tipo II lo presentan las especies que están aisladas dentro del citoplasma por estructuras producidas por la célula hospedadora, como la vacuola parasitófora en el género *Encephalitozoon* spp. y en el caso del género *Endoreticulatus*, una doble membrana derivada del retículo endoplasmático hospedador que rodea a los

parásitos. El tipo III está formado por las especies que se aíslan dentro de la célula hospedadora a través de estructuras producidas por el parásito como la vesícula esporofora en el género *Pleistophora*. En la interfase de tipo IV, las esporas están separadas del citoplasma de la célula hospedadora por estructuras derivadas tanto del parásito como de la propia célula. En este tipo se incluyen los géneros *Loma* y *Glugea*, cuyas esporas están rodeadas por el retículo endoplasmático durante la merogonia y posteriormente una vesícula esporofora se forma durante la esporogonia. En otras especies, la célula hospedadora y el parásito contribuyen con la formación de la interfase, como en el caso de *Trachipleistophora*.

1.2.6 Manifestaciones clínicas

La microsporidiosis en el hombre incluye un amplio espectro de patologías, las más frecuentes son las infecciones gastrointestinales, pero también se puede encontrar estos parásitos como agentes de infecciones pulmonares, nasales, oculares, musculares, cerebrales y sistémicas (Franzen y Muller 1999, 2001). El curso clínico de la microsporidiosis depende del estado inmune del hospedador, del sitio de infección y de la especie de microsporidio implicada en dicha infección. Las infecciones crónicas clínicamente silenciosas habitualmente se desarrollan en hospedadores inmunocompetentes, aunque se han descrito casos de infecciones con signos clínicos moderados en las etapas tempranas de la infección en este tipo de pacientes (Didier y col. 2004).

1.2.6.1 Infecciones intestinales

Las infecciones intestinales por microsporidios se han encontrado principalmente en personas VIH positivas con sida siendo *E. bienewsi* el principal agente asociado, seguido de *E. intestinalis* (Franzen y Muller 1999, 2001). Las infecciones se han descrito de forma más común en pacientes VIH positivos con recuentos de LTCD4+ por debajo de 100 cel/ μ l. Los parásitos causan frecuentemente una diarrea secretora severa, no sanguinolenta, sin moco, acompañada de varias deposiciones diarias, pérdida progresiva de peso y en muchos de los casos con síndrome de malabsorción de grasas, D-xylosa y

vitamina B12. La infección intestinal está asociada con deficiencia de lactasa, actividad reducida de fosfatasa alcalina y α -glucosidasa en la parte basal de la vellosidad, además de reducción en la altura y superficie de las vellosidades. La diarrea aparece gradualmente y puede continuar durante meses, aunque en algunos pacientes ésta puede ser intermitente, debido al curso natural de la infección o modificado por automedicación con antidiarreicos (Franzen y Muller 1999, 2001). Del Aguila y col. describieron el caso de un paciente VIH positivo con diagnóstico de microsporidiosis intestinal por *E. bieneusi* y una diarrea crónica durante 2 años (del Aguila y col. 1997).

1.2.6.2 Infecciones diseminadas

Las infecciones diseminadas por microsporidios están generalmente asociadas con especies del género *Encephalitozoon* y se presentan con mayor frecuencia en pacientes severamente inmunocomprometidos (Didier 1998, Franzen y Muller 1999, Didier y Weiss 2006, Franzen 2008). El espectro de enfermedades es amplio e incluyen queratoconjuntivitis, bronquiolitis, neumonía, sinusitis, nefritis, uretritis, cistitis, prostatitis, hepatitis, peritonitis, gastroenteritis y colangitis, pero los patrones de distribución son típicos de cada especie. *E. hellem* se ubica principalmente en la conjuntiva, tracto urinario, sinusoides nasales y sistema bronquial. *E. cuniculi* causa infecciones diseminadas que involucran casi todos los órganos, pero las manifestaciones clínicas varían substancialmente fluctuando entre asintomáticas hasta enfermedad severa. *E. intestinalis* se confina principalmente al tracto gastrointestinal y biliar con diseminación a riñón, ojos, sinusoides nasales, y algunas veces al tracto respiratorio (Franzen y Muller 1999, Schottelius y da Costa 2000, Franzen y Muller 2001). Sin embargo, también se han citado casos de diseminación por *E. bieneusi* (del Aguila y col. 1997, Georges y col. 1998, Bacchi y col. 2002, Sodqi y col. 2004), incluyendo el caso de un paciente VIH positivo con historia de microsporidiosis intestinal y al cual se le identificaron esporas de esta especie en esputo y lavado broncoalveolar (del Aguila y col. 1997).

1.2.6.3 Infecciones oculares

Además de las infecciones gastrointestinales, la microsporidiosis ocular es una de las manifestaciones clínicas más comunes en humanos. La queratoconjuntivitis puede estar causada por las 3 especies del género *Encephalitozoon* (*E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*) tanto en pacientes VIH positivo como VIH negativo (Didier y Weiss 2011). Las infecciones en personas inmunocompetentes se extienden de forma profunda en el estroma corneal, mientras que en los pacientes con sida, se limitan al epitelio superficial. En la mayoría de los pacientes VIH positivo se presenta una inflamación conjuntival bilateral y también pueden exhibir una queratopatía punteada bilateral que disminuye la agudeza visual. Frecuentemente la queratoconjuntivitis es asintomática o moderada, pero puede llegar a ser severa, y rara vez produce úlceras corneales. La queratitis se presenta menos frecuentemente que la conjuntivitis y se ha descrito principalmente en personas inmunocompetentes, asociándose con otras especies de microsporidios, incluyendo *V. corneae*, *Nosema* spp y *Trachipleistophora* spp. (Didier y Weiss 2011). Otros factores de riesgo, además de la infección por el VIH, asociados con el desarrollo de infecciones oculares por microsporidios incluyen el uso de lentes de contacto, el tratamiento a largo plazo con corticosteroides tópicos y la exposición a aguas turbias (Didier y Weiss 2011).

1.2.6.4 Sinusitis

La sinusitis es una manifestación común de la microsporidiosis humana. Se han descrito casos en pacientes VIH positivos, frecuentemente asociados con *Encephalitozoon* spp (*E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*). *E. bienewisi* y *T. hominis* también han sido detectados en biopsias de sinusoides de pacientes VIH positivos (Didier 1998, Franzen y Muller 1999, Didier y Weiss 2006, Franzen 2008). Estos pacientes sufrían de una rinitis severa así como también de pólipos nasales.

1.2.6.5 Infecciones pulmonares

Las infecciones pulmonares por microsporidios se han documentado con una menor frecuencia comparada con otras manifestaciones clínicas. Las infecciones del tracto respiratorio bajo pueden ser asintomáticas o estar asociadas con bronquiolitis y rara vez con neumonía o fallo respiratorio progresivo en pacientes VIH positivos. Las 3 especies del género *Encephalitozoon* se han detectado en el epitelio bronquial de pacientes VIH positivos con infecciones diseminadas. Del águila y col. aislaron *E. cuniculi* a partir de una muestra de esputo de un paciente con sida que presentaba, además de diarrea, fiebre y astenia (del Aguila y col. 2001). Varios casos de infección pulmonar por *E. bienewisi* también se han documentado (del Aguila y col. 1997, Georges y col. 1998, Bacchi y col. 2002, Sodqi y col. 2004). Lores y col. (Lores y col. 1999) identificaron la presencia de *E. bienewisi* en pacientes VIH positivo con sintomatología respiratoria (33,3%) y asintomáticos (10,8%); y en personas inmunocompetentes sintomáticas en un 13,6%.

1.2.6.6 Infecciones del tracto urinario y genital

Las infecciones del tracto urinario son uno de los hallazgos más comunes en pacientes VIH positivos con infecciones diseminadas por *Encephalitozoon* spp. La presentación clínica puede variar de forma marcada, siendo asintomática con o sin microhematuria, puede presentarse una cistitis y nefritis intersticial con disuria y hematuria grave, o se puede producir un fallo renal progresivo (Didier 1998, Franzen y Muller 1999, Didier y Weiss 2006, Franzen 2008).

La infección del tracto genital femenino por microsporidios es rara, con solo dos estudios publicados en la literatura (Tosoni y col. 2002, Torres y col. 2013). Tosoni y col. (Tosoni y col. 2002) encontraron esporas de microsporidios en tejido necrótico procedente de varios órganos de una mujer italiana con sida, incluyendo el ovario. Torres y col. (Torres y col. 2013) identificaron la presencia de microsporidios (*E. cuniculi* y *E. hellem*) en muestras de tejidos provenientes del aparato reproductor (ovario, trompa uterina y útero) de mujeres fallecidas con síndrome de desgaste asociado al sida y microsporidiosis diseminada.

1.2.6.7 Miositis

La miositis causada por microsporidios está asociada con los géneros *Pleistophora*, *Traquipleistophora* y recientemente *Tubulinosema* (Choudhary y col. 2011). Hasta la fecha se han descrito unos pocos casos en pacientes inmunocomprometidos. Las manifestaciones incluyen debilidad muscular generalizada y fiebre, y generalmente las esporas de los microsporidios pueden observarse en los análisis histopatológicos de biopsias musculares.

1.2.6.8 Infecciones cerebrales

Se han descrito casos de infecciones cerebrales en pacientes con microsporidiosis diseminada. Los síntomas incluyen dolor de cabeza, vomito, convulsiones espásticas y episodios convulsivos (Didier y Weiss 2006, Didier y Weiss 2008, Franzen 2008).

En la Tabla 4, se describen los principales microsporidios asociados con enfermedad en humanos.

Tabla 4. Principales microsporidios asociados con infecciones en humanos

| ESPECIE | Tamaño (µm) | Descubrimiento | | | Reservorios animales | MANIFESTACIONES CLÍNICAS |
|-------------------------------------------|-----------------------|----------------|------------|-------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | Año | Hospedador | Referencia | | |
| <i>Enterocytozoon bieneusi</i> | 1,1–1,6 x 0,7–1,0 | 1985 | Hombre | (Desportes y col. 1985) | Mamíferos, aves | Enteritis, diarrea, colangitis, colecistitis, neumonitis, bronquitis, sinusitis, rinitis |
| <i>Encephalitozoon intestinalis</i> | 1,2–2,0 x 0,9–1,2 | 1993 | Hombre | (Cali y col. 1993) | Mamíferos, Aves | Enteritis, diarrea, colangitis, colecistitis, nefritis, infecciones del tracto urinario, sinusitis, rinitis, bronquitis, queratoconjuntivitis, infecciones diseminadas |
| <i>Encephalitozoon hellem</i> | 2,0–2,5 x 1,0–1,5 | 1991 | Hombre | (Didier y col. 1991) | Aves | Queratoconjuntivitis, sinusitis, rinitis, neumonitis, bronquiolitis, nefritis, uretritis, prostatitis, uretritis, cistitis, infección diseminada |
| <i>Encephalitozoon cuniculi</i> | 2,0–2,5 x 1,0–1,5 | 1923 | Conejo | (Franzen 2008) | Mamíferos | Hepatitis, peritonitis, encefalitis, infección intestinal, infección del tracto urinario, queratoconjuntivitis, sinusitis, rinitis, infección diseminada |
| <i>Trachipleistophora hominis</i> | 4,0 x 2,4 | 1996 | Hombre | (Franzen 2008) | Desconocido | Miositis, queratoconjuntivitis, sinusitis, rinitis |
| <i>Trachipleistophora anthropophthera</i> | 2,2–3,7 x 1,8–2 | 1998 | Hombre | (Franzen 2008) | Desconocido | Infección diseminada, infecciones oculares |
| <i>Pleistophora ronneae</i> ^a | 2,0–2,8 x 3,0–4,0 | 1985 | Hombre | (Franzen 2008) | Peces | Miositis |
| <i>Vittaforma corneae</i> ^b | 3,05–4,55 x 0,77–1,27 | 1990 | Hombre | (Franzen 2008) | Desconocido | Queratitis, infección del tracto urinario |
| <i>Nosema ocularum</i> | 2,5–5,0 x 2,0–2,5 | 1991 | Hombre | (Franzen 2008) | Desconocido | Queratoconjuntivitis |
| <i>Ancaliia connor</i> ^c | 2,5–2,9 x 1,9–2,0 | 1974 | Hombre | (Franzen 2008) | Desconocido | Infección diseminada |
| <i>Ancaliia algerae</i> ^c | 2,4 x 4 | 1970 | Mosquito | (Franzen 2008) | Mosquitos | Queratoconjuntivitis, miositis |
| <i>Ancaliia vesicularum</i> ^c | 2,5–2,9 x 1,9–2,0 | 1998 | Hombre | (Franzen 2008) | Desconocido | Miositis |
| <i>Microsporidium ceylonensis</i> | 1,5 x 3,5 | 1973 | Hombre | (Franzen 2008) | Desconocido | Úlcera corneal |
| <i>Microsporidium africanum</i> | 4,5 x 1,5 | 1981 | Hombre | (Franzen 2008) | Desconocido | Úlcera corneal |
| <i>Tubulinosema</i> spp. | 1,4 x 2,4 | 2011 | Hombre | (Choudhary y col. 2011) | Insectos | Miositis |

^a Especies del género *Pleistophora* infectan peces, pero hasta el momento se desconoce si *P. ronneae* lo hace. ^b Anteriormente *Nosema*. ^c Anteriormente *Nosema* y *Brachiol*

1.2.7 Epidemiología

Antes de la aparición de la pandemia del sida, los microsporidios se reconocían como agentes patógenos en una gran variedad de animales de importancia económica en la agricultura (peces, animales de peletería e insectos como abejas y gusanos de seda) así como también en animales de laboratorio (conejos, roedores y primates) (Franzen y Muller 2001, Didier y col. 2004, Franzen 2008). Sin embargo, desde mediados de la década de los ochenta, estos parásitos llamaron la atención, con más de 400 casos descritos en pacientes con sida y prevalencias de hasta un 70% en la población VIH positiva con diarrea crónica. Es importante aclarar que la infección por microsporidios no es exclusiva del paciente severamente inmunocomprometido; parece que también puede emerger como infección en pacientes sometidos a trasplantes de órganos (Metge y col. 2000, Goetz y col. 2001, Latib y col. 2001), VIH positivos asintomáticos, e incluso individuos inmunocompetentes (Wanke y col. 1996, Desportes-Livage y col. 1998, Raynaud y col. 1998, Cegielski y col. 1999).

1.2.7.1 Distribución geográfica y prevalencia en humanos

La microsporidiosis se considera una parasitosis de distribución cosmopolita. A partir de la descripción de estos parásitos como agentes de infección humana, el número de casos informados ha incrementado notablemente; aunque la verdadera prevalencia no se conoce; y los casos a nivel mundial son variables, dependiendo de la región geográfica, método de diagnóstico utilizado y características demográficas de la población estudiada (Tabla 5). Hasta la fecha se han documentado casos en personas de los cinco continentes siendo la inmensa mayoría de éstos, enfermos de sida (Didier y col. 2004, Anane y Attouchi 2010, Matos y col. 2012).

Tabla 5. Prevalencia de microsporidiosis a nivel mundial

| Autores | Año | País | Número de casos | Población estudiada | Prevalencia (%) | Método de diagnóstico | Referencias bibliográficas |
|-------------------------|------------|-------------|------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------|
| Michiels y col. | 1992 | Francia | 207 | VIH (+) | 3,38 | Microscopía electrónica | (Anane y Attouchi 2010) |
| Kotler y Orenstein | 1994 | USA | 250 | VIH/sida | 39 | PCR | (Kotler y Orenstein 1994) |
| Liguory y col. | 1996 | Francia | 100 | VIH (+) | 39 | PCR | (Anane y Attouchi 2010) |
| Coyle y col. | 1996 | USA | 111 | VIH (+) con diarrea | 44 | PCR | (Coyle y col. 1996) |
| | | | | VIH (+) sin diarrea | 2,3 | | |
| Aoun y col. | 1997 | Tunez | 12 | VIH (-) ^a | 16,7 | Tinción tricrómico modificado y uvitex 2B | (Anane y Attouchi 2010) |
| Billaud y col. | 1997 | Francia | 682 | VIH (+) | 2,9 | Tinción tricrómico modificado y uvitex 2B | (Anane y Attouchi 2010) |
| Sobottka y col. | 1998 | Alemania | 97 | VIH (+) con diarrea | 36 | Tinción tricrómico modificado y uvitex 2B | (Sobottka y col. 1998) |
| | | | | VIH (+) sin diarrea | 4,3 | | |
| Gamboa-Dominguez y col. | 1999 | Mexico | 98 | VIH (+) | 31 | Hematoxilina-eosina y Giemsa | (Gamboa Dominguez y col. 1999) |
| Brasil y col. | 1999 | Brasil | 40 | VIH (+) | 27,5 | Tricromico modificado, Gram cromotropo y PCR | (Brasil y col. 1999) |
| Brandonisio y col. | 1999 | Italia | 154 | VIH (+) con diarrea | 9,23 | Tinción tricrómico modificado | (Brandonisio y col. 1999) |
| | | | | VIH (+) sin diarrea | 1,12 | | |

Introducción: continuación de la tabla 5

| Autores | Año | País | Número de casos | Población estudiada | Prevalencia (%) | Método de diagnóstico | Referencias bibliográficas |
|-----------------------|------------|--------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Lebbad y col. | 2001 | Guinea | 52 | VIH (+) VIH (-) ^b | 11 0 | Tinción tricrómico modificado | (Anane y Attouchi 2010) |
| Ferreira y col. | 2001 | Portugal | 215 | VIH (+) | 42,8 | Tinción tricrómico modificado y Blanco de calcofluor M2R | (Anane y Attouchi 2010) |
| Wanachiwanawin y col. | 2002 | Tailandia | 182 | VIH (+) VIH (-) | 25,3 14,9 | Tinción tricrómico modificado | (Wanachiwanawin y col. 2002) |
| Bern y col. | 2004 | Perú | 2652 | VIH (+) | 3 | Tinción tricrómico modificado | (Anane y Attouchi 2010) |
| Botero y col. | 2004 | Colombia | 103 | VIH (+) | 3,9 | Gram cromotropo rápido en caliente y PCR | (Botero y col. 2004) |
| Konate y col. | 2005 | Mali | 70 | VIH (+) | 11,5 | PCR | (Anane y Attouchi 2010) |
| Lejeune y col. | 2005 | Vietnam | 72 | VIH (+) | 1,38 | PCR | (Anane y Attouchi 2010) |
| Tumwine y col. | 2005 | Uganda | 243 | VIH (+) VIH (-) | 76,9 6,6 | PCR | (Tumwine y col. 2005) |
| Endeshaw y col. | 2006 | Etiopia | 243 | VIH (+) VIH (-) ^b | 18,2 0 | PCR | (Anane y Attouchi 2010) |
| Chacin-Bonilla y col. | 2006 | Venezuela | 103 | VIH (+) | 13,6 | Tinción tricrómico modificado | (Anane y Attouchi 2010) |
| Sarfati y col. | 2006 | Camerún | 154 | VIH (+) | 5,2 | PCR | (Anane y Attouchi 2010) |
| Dworkin y col. | 2007 | USA | 737 | VIH (+) | 1,5 | Tinción de gram cromotropo 2R rápida en caliente | (Anane y Attouchi 2010) |
| Esporn y col. | 2007 | Nigeria Vietnam | 228 42 | VIH (+) | 10,5 9,5 | PCR | (Anane y Attouchi 2010) |

Introducción: continuación de la tabla 5

| Autores | Año | País | Número de casos | Población estudiada | Prevalencia (%) | Método de diagnóstico | Referencias bibliográficas |
|------------------|------|-----------------|-----------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------|
| Nkinin y col. | 2007 | Camerún | 191 | VIH (+) con Tbc VIH (-) con Tbc VIH (-) sin Tbc | 35,7 24 67,5 Global: 58,1 | Blanco de calcofluor | (Anane y Attouchi 2010) |
| Samie y col. | 2007 | Sur África | 322 | VIH (+) VIH (-) ^d | 11,2 | PCR | (Anane y Attouchi 2010) |
| Norhayati y col. | 2008 | Malasia | 893 | VIH (+) VIH (-) ^e | 13 | Tinción gran cromotropo modificado | (Anane y Attouchi 2010) |
| Anane y col. | 2009 | Túnez | 119 | VIH (+) VIH (-) ^f | 9,3 | PCR | (Anane y Attouchi 2010) |
| Calik y col. | 2011 | Turquía | 1181 | VIH (-) ^g | 7,8 | Tricromico modificado y Calcofluor | (Calik y col. 2011) |
| Sokolova y col. | 2011 | Rusia | 159 | VIH (+) | 18,9 | Tricromico modificado y PCR | (Sokolova y col. 2011) |
| Sak y col. | 2011 | República Checa | 382 | VIH (-) ^f | 42 | Blanco de calcofluor y PCR | (Sak y col. 2011) |
| Wumba y col. | 2012 | Congo | 242 | VIH (+) | 8,2 | Inmunofluorescencia y PCR | (Wumba y col. 2012) |
| Saigal y col. | 2012 | India | 283 | VIH (+) | 15,9 | PCR | (Saigal y col. 2012) |
| Ojuromi y col. | 2012 | Nigeria | 193 | VIH (+) | 23,3 | Tricromico modificado, Inmunofluorescencia y PCR | (Ojuromi y col. 2012) |
| Lobo y col. | 2012 | Portugal | 856 | VIH (+) VIH (-) | 13,9 8,5 | PCR | (Lobo y col. 2012) |

a. Niños con inmunodeficiencia primaria b. Personas inmunocompetentes con diarrea c. Ancianos d. Niños inmunocompetentes y pacientes hospitalizados e. Personas con diversas enfermedades (diabetes, enfermedades hematológicas malignas), personas inmunocompetentes f. Personas inmunocompetentes g. Niños con síntomas gastrointestinales.

Los datos sobre la prevalencia de los microsporidios antes de la aparición del sida, se basaban en estudios serológicos mediante la detección de anticuerpos anti- *E. cuniculi*, el único microsporidio de mamíferos que podía cultivarse, y por lo tanto a partir del cual se obtenía antígeno suficiente para dichos estudios (Didier y col. 2004). Aunque estos datos reflejaban una seroprevalencia en un rango de 0 a 42%, el hecho de que las tasas más altas se encontraran principalmente en homosexuales y personas con otras infecciones parasitarias (Didier y col. 2004) limitó la fiabilidad de estos resultados, teniendo en cuenta la alta probabilidad de reacciones cruzadas, lo que a su vez podría generar falsos positivos. Con la aparición del sida, se identificaron nuevas especies de microsporidios, y se desarrollaron métodos de diagnóstico que incluían técnicas serológicas más complejas (utilizando antígenos de las nuevas especies que se podían cultivar), detectándose una seroprevalencia entre un 1,3 a un 8% en personas VIH negativas (incluyendo donantes de sangre, trabajadores de mataderos, criadores de perros, trabajadores forestales y embarazadas, entre otros). En España, Del Aguila y col. (del Aguila y col. 2001) detectaron una seroprevalencia del 5,4% en donantes de sangre, utilizando antígenos de *E. intestinalis*. Con estos datos se confirmó que la microsporidiosis no era una infección exclusiva de individuos VIH/sida (Franzen y Muller 2001, Didier y col. 2004, Franzen 2008).

Los casos de microsporidiosis en individuos inmunocompetentes han ido aumentando conforme al establecimiento de métodos diagnósticos más sensibles como la PCR. En los individuos inmunocompetentes la microsporidiosis se asocia principalmente con infecciones de viajeros que proceden de países en desarrollo, como también de residentes en países tropicales (Didier y col. 2004, Anane y Attouchi 2010, Matos y col. 2012). Se han descrito prevalencias de 3,3-10% en viajeros (Lopez-Velez y col. 1999, Muller y col. 2001), 5,9–17,4% en niños con y sin diarrea (Lores 1999, Valperga y col. 1999, Chokephaibulkit y col. 2001, Wanachiwanawin y col. 2002, Didier y Weiss 2008, Matos y col. 2012), y 17,02% en ancianos (Lores y col. 2002).

Enríquez y col. (Enriquez y col. 1998) realizaron uno de los primeros estudios para evaluar la prevalencia de *Encephalitozoon* spp en dos grandes áreas rurales de México, estudiando 70 familias con un total de 255 individuos. Mediante el uso de anticuerpos monoclonales e inmunofluorescencia determinaron que 20 (7,8%) de los 255 individuos eliminaban esporas de microsporidios pertenecientes al género *Encephalitozoon* y que el 21,4% de las familias tenían al menos un miembro positivo para el parásito (Enriquez y col. 1998). Estudios posteriores permitieron identificar la especie implicada como *E. intestinalis*, identificándose también *E. bienewsi* y la presencia de infecciones mixtas (Bornay-Llinares y col. 1998). Estos resultados permitieron concluir que ambas especies estaban presentes en las comunidades estudiadas, en una proporción significativa de individuos cuyo riesgo no está asociado a una inmunodeficiencia, pero podría estar relacionado con factores como la presencia de otros patógenos intestinales concomitantes, mala higiene y/o contaminación del agua (Enriquez y col. 1998). Raynaud publicó un caso de infección por *E. intestinalis* en un individuo VIH negativo cuyo compañero también era portador del parásito (Raynaud y col. 1998). Otros autores han descrito la presencia de *E. intestinalis* en muestras de materia fecal de hombres VIH negativos, junto con *Cystoisospora belli* después de haber regresado de un viaje a Brasil (Franzen y Muller 1999).

En cuanto a la prevalencia en personas con sida, los datos se basan en pruebas directas que detectan las esporas de estos parásitos. La microsporidiosis intestinal es la presentación más común, siendo *E. bienewsi* la especie identificada en la mayor parte de los casos (Didier y col. 2004, Didier y Weiss 2008). A nivel mundial se ha descrito una prevalencia de un 5 a 50%, y estudios realizados en Europa y Estados Unidos revelan cifras entre un 6 y 50% en este grupo de pacientes (Didier y col. 2004). Teniendo en cuenta los datos aportados en estos estudios, se ha estimado una prevalencia general de microsporidiosis en pacientes con sida de un 15% (Didier y col. 2004). En ciertas regiones, la mayoría de los casos de microsporidiosis se dan en pacientes VIH/sida, esta situación se da con frecuencia en el Sureste de Asia

(India, Tailandia), Europa, África (Túnez, Mali, Uganda, Senegal, Zimbabwe) y Latinoamérica (Mexico, Brasil, Perú, Colombia) (Brasil y col. 1998, Franzen y Muller 1999, Gamboa Dominguez y col. 1999, Botero y col. 2004, Bern y col. 2005, Didier y Weiss 2006, Didier y Weiss 2008, Anane y Attouchi 2010, Ojuromi y col. 2012).

Desde la implementación de la terapia antirretroviral, el número de casos de microsporidiosis en países desarrollados ha disminuido considerablemente, sin embargo, en regiones en desarrollo, como el África sub-sahariana, en donde viven las dos terceras partes de la población VIH positiva, este tratamiento aún no es de amplio uso, por lo que esta parasitosis continua siendo una causa de gran morbi-mortalidad (Didier y col. 2004, Mathis y col. 2005, Didier y Weiss 2008, Anane y Attouchi 2010).

En España aún son escasos los datos referentes a estos parásitos, sin embargo, se han descrito casos de microsporidiosis en pacientes VIH/sida (del Aguila y col. 1997, del Aguila y col. 1997, del Aguila y col. 2001); personas VIH negativas, incluyendo viajeros procedentes de los trópicos (Lopez-Velez y col. 1999), ancianos (Lores y col. 2002) y población inmunocompetente (Abreu-Acosta y col. 2005), siendo *E. bienensis* la especie más frecuente (Tabla 6).

Tabla 6. Microsporidiosis en España: estudios de prevalencia y descripción de casos

| Edad | Estado inmunológico | Síntomas | Prevalencia (%) | Especie | Referencia bibliográfica |
|----------|---------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Adulto | VIH (+) | Diarrea | 1 ^a | ND | (Flores y col. 1993) |
| Adulto | VIH (+) | Diarrea | 1 ^a | <i>E. bienewsi</i> | (Candia y col. 1994) |
| Adultos | VIH (+) | Diarrea | 3 ^a | <i>E. bienewsi</i> | (Miro y col. 1995) |
| Adultos | VIH (+) | Diarrea | 2 ^a | <i>E. bienewsi</i> | (Bornay-Llinares y col. 1996) |
| Adultos | VIH (+) | Diarrea | 4 ^a | <i>E. bienewsi</i> | (Subirats y col. 1996) |
| Niños | VIH (+) | Diarrea | 2% | <i>E. bienewsi</i> | (del Aguila y col. 1997) |
| | | Sin diarrea | 1,2% | | |
| Adultos | VIH (+) | Diarrea | 12% | <i>E. bienewsi</i> | (del Aguila y col. 1997) |
| Adultos | VIH (+) | Diarrea | 1 ^a | <i>E. bienewsi</i> | (del Aguila y col. 1997) |
| Adultos | IC | Diarrea | 2 ^a | <i>E. bienewsi</i> | (Gainzarain y col. 1998) |
| Adultos | VIH (+) VIH (-) | Diarrea | 4 ^a | <i>E. bienewsi</i> | (Lopez-Velez y col. 1999) |
| Adultos | VIH (+) | Síntomas respiratorios con y sin diarrea | 10,8% ^d | <i>E. bienewsi</i> | (Lores y col. 1999) |
| | | Sin síntomas respiratorios; con y sin diarrea | 18,1% ^d | | |
| Adulto | VIH (+) | Diarrea | 1 ^a | <i>E. cuniculi</i> | (del Aguila y col. 2001) |
| Ancianos | IC | Diarrea | 17,02% | <i>E. bienewsi</i> | (Lores y col. 2002) |
| Adultos | IC | Si | 11,54% 2,5% ^b 16,22% ^c | <i>E. bienewsi</i> | (Abreu-Acosta y col. 2005) |
| Adultos | IC ^e | Asintomáticos | 30% | <i>E. bienewsi</i> <i>E. cuniculi</i> <i>E. hellem/E. intestinalis</i> | (Andreu-Ballester y col. 2013) |
| Adultos | IC ^f | Con y sin diarrea | 22,2% | <i>E. hellem/E. intestinalis</i> | (Andreu-Ballester y col. 2013) |

^aNúmero de casos descritos. Se evaluaron muestras de ^borina y ^cesputo. ^dSe evaluaron muestras de heces, esputo y lavado broncoalveolar. ^ePacientes con enfermedad de Crohn. ^fPacientes con otras enfermedades (ileitis no específica, diarrea crónica).

1.2.7.2 Fuentes de infección y modos de transmisión

A pesar del creciente número de casos de microsporidiosis, poco se conoce sobre las fuentes y mecanismos de infección de estos parásitos. Existe evidencia de que la infección puede transmitirse por múltiples vías, siendo las más importantes la vía oral y respiratoria (Didier y col. 2004, Franzen 2008). Adicionalmente se ha descrito la transmisión por contacto con los ojos y por vía sexual (Didier y col. 2004). En relación a esta última, datos obtenidos en un estudio realizado en Suecia, mostraron que un 33% de hombres homosexuales tenían anticuerpos anti-*E. cuniculi*, sugiriendo que las prácticas homosexuales podían contribuir en la transmisión de la microsporidiosis (Didier y col. 2004, Anane y Attouchi 2010). Además la identificación de esporas de microsporidios en la uretra y próstata de pacientes con sida y uretritis y abscesos prostáticos es un argumento a favor de la transmisión sexual de estos parásitos (Anane y Attouchi 2010). La transmisión vertical por vía congénita se ha demostrado en animales (conejos, ratones, perros, caballos, zorros y monos) infectados con *E. cuniculi*; sin embargo en humanos aún no se ha descrito este tipo de transmisión (Didier y col. 2004, Franzen 2008, Anane y Attouchi 2010).

1.2.7.2.1 Potencial zoonótico

La transmisión zoonótica de la microsporidiosis es probable ya que un amplio rango de animales se pueden infectar con especies y genotipos de microsporidios que infectan a humanos, y el contacto con animales se ha descrito como uno de los factores de riesgo asociados con la microsporidiosis en personas VIH positivas (Hutin y col. 1998, Dascomb y col. 2000). Diversos estudios han realizado con éxito infecciones experimentales de varios animales con esporas del género *Encephalitozoon*, mediante su inóculo por diferentes vías, como la oral, traqueal y rectal (Cox y col. 1986, Shadduck y Greeley 1989, Fuentealba y col. 1992, Koudela y col. 1993). Sin embargo, aún no hay evidencia directa que pruebe la transmisión de los animales al hombre, con la excepción del caso de una niña de 10 años de edad, que tuvo una seroconversión después de un estrecho contacto con un perro infectado con *E. cuniculi* (McInnes y Stewart 1991).

En el caso de *E. bieneusi* y *E. intestinalis*, las especies más frecuentes en humanos, estos se han descrito en una amplia variedad de hospedadores que incluyen mamíferos domésticos y silvestres (Dengjel y col. 2001, Lores y col. 2002, Mathis y col. 2005, Lobo y col. 2006), y aves (Reetz y col. 2002, Haro y col. 2005, Haro y col. 2006, Lobo y col. 2006, Graczyk y col. 2007, Bart y col. 2008, Leitch y He 2012). Estos animales pueden actuar como reservorios, facilitando la contaminación ambiental. Especies de microsporidios que infectan humanos y que también se han encontrado en animales se describen en la Tabla 4.

En España se ha detectado la presencia de microsporidios en animales domésticos como perros, conejos y cabras (del Aguila y col. 1999, del Aguila y Izquierdo 2004, Izquierdo 2007), y silvestres como palomas de parques (Haro y col. 2005, Haro y col. 2006). (Tabla 7).

Tabla 7. Prevalencia de microsporidios en animales domésticos y silvestres de España

| Animal | Prevalencia (%) | Especie | Referencia bibliográfica |
|-------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Perros | 9,6% | <i>E. bieneusi</i> | (Izquierdo 2007) |
| | 11,7% | <i>E. bieneusi</i> | (Lores y col. 2002) |
| Gatos | 11,1% | <i>E. intestinalis</i> | (Izquierdo 2007) |
| Animales domesticos de parques de Madrid* | 28% | <i>E. bieneusi</i> <i>E. hellem</i> | (Dado y col. 2012) |
| Cabras | 14,2% | <i>E. bieneusi</i> | (Lores y col. 2002) |
| Conejos | 9% | <i>E. cuniculi</i> | (Lores y col. 2002) |
| | 21% | <i>E. bieneusi</i> | (Izquierdo 2007) |
| Cerdos | 26,5% | <i>E. bieneusi</i> <i>E. intestinalis</i> | (Izquierdo 2007) |
| Palomas | 29% | <i>E. bieneusi</i> <i>E. intestinalis</i> <i>E. hellem</i> | (Haro y col. 2005) |

*Presumiblemente perros y gatos

1.2.7.2.2 Transmisión hídrica

Los microsporidios presentan varias características que favorecen su transmisión hídrica. En primer lugar, se ha observado que las especies de microsporidios que infectan humanos carecen de especificidad de hospedador y pueden ser fácilmente excretadas en la orina y heces de animales infectados, lo que favorece a su vez la contaminación del agua (Didier y col. 2004). Además, las esporas de estos parásitos son resistentes al ambiente y logran sobrevivir durante largos periodos en el agua; su tamaño es pequeño, por lo que pueden escapar a los procesos de filtración utilizados en el tratamiento de aguas y se cree que la dosis infecciosa en mamíferos es baja (Franzen y Muller 1999).

La pared quitinosa de la espora le confiere a estos microorganismos cierta protección frente a diversas condiciones ambientales. Diferentes estudios apoyan esta teoría. Bajo condiciones experimentales, utilizando tanto modelos de crecimiento *in vitro* como modelos de infección en animales, se ha demostrado que las esporas de *E. cuniculi* permanecen viables e infecciosas después de la exposición a diferentes temperaturas (en un rango entre 4 a 22°C) en periodos que variaban entre pocos días hasta meses (Didier y col. 2004); e incluso estas esporas no se destruyen bajo condiciones extremas de deshidratación, ciclos de congelación y descongelación y tratamiento con soluciones ácidas y alcalinas (Didier y col. 2004). Otros autores han determinado que esporas de *E. hellem* y *E. intestinalis* pueden sobrevivir después de su incubación a temperaturas entre 10 a 30°C durante semanas y meses (Tanriverdi y col. 2008).

Se ha establecido en distintos estudios epidemiológicos que el contacto con el agua es un factor de riesgo frecuentemente asociado con la microsporidiosis (Hutin y col. 1998, Dascomb y col. 2000), demostrándose una estrecha relación entre dicha infección y la exposición a aguas recreacionales, jacuzzis, aguas de consumo y residuales, entre otras. Además, se ha descrito una mayor tasa de infección por estos parásitos en personas que viven cerca de sistemas de distribución de agua en Francia (Cotte y col. 1999).

Se han identificado varias especies de microsporidios patógenos de humanos en aguas superficiales, subterráneas y estancadas, incluyendo *E. intestinalis*, *E. bienewisi*, *A. algerae*, especies de *Nosema*, especies de *Pleistophora* y *V. corneae* (Avery y Undeen 1987, Sparfel y col. 1997, Dowd y col. 1998, Fournier y col. 2000, Fournier y col. 2002, Thurston-Enriquez y col. 2002, Dowd y col. 2003, Coupe y col. 2006, Graczyk y col. 2007, Graczyk y col. 2007, Lobo y col. 2008, Izquierdo y col. 2011).

A pesar de los datos publicados hasta el momento, aún faltan estudios que definan el verdadero riesgo de transmisión hídrica de la microsporidiosis, así como también esfuerzos para estandarizar métodos de detección y eliminación de estos parásitos en el agua.

1.2.7.2.3 Transmisión a través de alimentos

Como resultado de la globalización de los alimentos, la aceleración en el transporte de la comida, el aumento de los viajes de los consumidores y cambios en los patrones de consumo, muchos microorganismos se consideran agentes potencialmente transmisibles a través de los alimentos, entre los que podemos incluir a los microsporidios (Slifko y col. 2000, Didier y col. 2004). Aunque no hay una evidencia directa, diferentes investigaciones sugieren que en el caso de los microsporidios, este modo de transmisión es probable. En un estudio epidemiológico realizado por Hutin y col. (Hutin y col. 1998), se mostró que el consumo de carne poco cocida fue uno de los factores de riesgo asociados con la microsporidiosis en pacientes VIH positivos. Estudios filogenéticos han sugerido una estrecha relación entre *T. hominis* (que causa miositis en humanos) y especies de los géneros *Pleistophora* spp. (que infecta peces y humanos) y *Vavraia* (que infecta insectos). Esto llevó a sugerir que podían existir dos posibles mecanismos de infección en los pacientes con sida; mediante ya sea la ingestión de pescado o crustáceos poco cocidos o crudos ó por la inoculación percutánea de esporas del parásito por la picadura de insectos hematófagos (Didier y col. 2004). La hipótesis de que la ingestión de pescado crudo pueda favorecer la infección por microsporidios parece apoyarse

en observaciones realizadas por McDougall y col. (McDougall y col. 1993), quienes describieron un paciente con sida que eliminaba esporas de microsporidios que se aislaron en el interior de fibras musculares, y concluyeron que el paciente pudo haber comido carne cruda contaminada. Otras evidencias circunstanciales podrían explicar la transmisión de los microsporidios a través de alimentos. Se han identificado esporas de *E. intestinalis* no solamente en los sistemas de irrigación de cultivos (Thurston-Enriquez y col. 2002) sino también en ciertas verduras, frutas y zumos (Didier y col. 2004).

Hasta la fecha solo se ha documentado un brote de microsporidiosis asociado a la ingestión de alimentos en un hotel de Suecia (Decraene y col. 2012). *E. bienewsi* fue el microsporidio identificado y los autores propusieron que las rodajas de pepino utilizadas para la preparación de emparedados y ensaladas pudo ser la fuente de infección. Aunque no se pudo hacer la búsqueda del parásito en los alimentos, el hecho de haber encontrado el mismo genotipo de *E. bienewsi* en las muestras de pacientes analizadas y no haber identificado otro microorganismo asociado a la sintomatología, sugirió que este microsporidio fue el agente causal del brote.

1.2.7.2.4 Transmisión por artrópodos

La posibilidad de la transmisión de los microsporidios a través de artrópodos se ha planteado desde que *A. algerae* (patógeno de mosquitos) se identificó y aisló de la córnea de un paciente inmunocomprometido (Visvesvara y col. 1999). Además, posteriormente se describió como agente causal de miositis en una mujer diabética con artritis reumática (Didier y col. 2004). Estos hallazgos mostraron que los microsporidios patógenos de insectos, también podían asociarse con infecciones en humanos. Ribeiro y col. (Ribeiro y Guimaraes 1998) aislaron esporas con morfología similar a las del género *Encephalitozoon* en células epiteliales del intestino delgado y glándulas salivales de garrapatas, indicando que los microsporidios podían transmitirse a hospedadores mamíferos durante la ingestión de sangre por parte de estos artrópodos. Weidner y col. (Weidner y col. 1999) fueron capaces de infectar mosquitos con *T. hominis*, y

durante la infección, se observaron esporas del parásito en el intestino del mosquito, por lo que los autores infirieron que estas se podían inocular a hospedadores mamíferos durante la alimentación del insecto. Aunque no hay una evidencia directa de este tipo de transmisión, los estudios previos y el hecho de que los artrópodos sean los principales reservorios de los microsporidios, sugieren que dicha transmisión puede producirse.

1.2.8 Diagnóstico

1.2.8.1 Microscopia electrónica (MET)

Inicialmente, la identificación de los microsporidios se basaba en el estudio de las características ultraestructurales de estos parásitos mediante microscopía electrónica. La presencia del túbulo polar se consideraba como la característica principal del *Phylum*, por lo tanto su observación era el principal criterio diagnóstico. En la actualidad, esta técnica persiste como la prueba de oro o estándar para la confirmación e identificación de especie de estos parásitos y las entradas taxonómicas. Mediante ésta se han podido detectar esporas de microsporidios en biopsias de diferentes tejidos y en muestras biológicas como heces, liquido biliar, aspirado duodenal, orina, esputo y lavado broncoalveolar (Didier y col. 2004, Didier y Weiss 2008, Franzen 2008, Ghosh y Weiss 2009, Anane y Attouchi 2010). En muestras fecales los restos y las bacterias hacen que la MET sin lavados y previa concentración de las esporas sea difícil, por lo que la sensibilidad de este método no está establecida (Weber y col. 1994). Además, a diferencia de los tejidos, en donde se pueden observar todos los estadios del ciclo de vida del parásito, en la materia fecal y fluidos corporales solamente son visibles las esporas maduras.

La principal ventaja de MET es su alta especificidad, sin embargo, no es una técnica que se pueda aplicar de rutina en el diagnóstico de la microsporidiosis, ya que consume mucho tiempo tanto en la preparación de la muestra como en su evaluación, es costosa , requiere un personal altamente cualificado y ha demostrado tener una baja sensibilidad, especialmente en heces y otros fluidos (Franzen y Muller 1999, 2001, Franzen 2008, Parida y col. 2008).

La MET también ha sido útil en la descripción de otras características ultraestructurales de los microsporidios, incluyendo el número de vueltas del tubo polar, las formas proliferativas de desarrollo, tipo de división celular, número de núcleos y naturaleza de la interfase parásito-célula hospedadora; características que se han tenido en cuenta en la clasificación de estos parásitos (Franzen y Muller 1999, 2001). Sin embargo, existen especies de microsporidios que son morfológicamente idénticas y ultraestructuralmente similares (*E. hellem* y *E. cuniculi*), por lo que se requieren métodos inmunológicos, bioquímicos y/o moleculares para la identificación de la especie (Franzen y Muller 1999, 2001).

Aunque MET sigue siendo una herramienta valiosa en los estudios taxonómicos de los microsporidios, los datos morfológicos y ultraestructurales que se obtienen con esta técnica no proveen suficiente información para producir clasificaciones robustas. De hecho, algunas de estas características (número de núcleos; número de esporas o esporontes; longitud, disposición y estructura del túbulo polar, entre otras) pueden variar rápidamente durante la adaptación del parásito a diferentes hospedadores o tejidos y otras (ser diplocariotes, desarrollo en contacto directo con el citoplasma hospedador) parecen haber evolucionado varias veces y simultáneamente en diferentes linajes de microsporidios (Franzen 2008, Anane y Attouchi 2010). Teniendo en cuenta estas limitaciones, las nuevas clasificaciones de estos parásitos tienen en cuenta tanto los datos de MET como los aportados por los métodos moleculares, lo que ha permitido incluso esclarecer la organización taxonómica de ciertos microsporidios, como en el caso de la reciente reclasificación de las especies de *Brachiola* en el género *Ancaliia* (Didier y Weiss 2008).

1.2.8.2 Microscopia óptica

El diagnóstico de la microsporidiosis depende de la identificación de esporas en muestras clínicas que incluyen heces, aspirado duodenal, orina, muestra de conjuntiva, lavado broncoalveolar, esputo, aspirado nasal o biopsias (Franzen y Muller 2001, Garcia 2002, Didier y Weiss 2006, Didier y Weiss 2008, Franzen

2008, Anane y Attouchi 2010). Originalmente, el diagnóstico definitivo de estos parásitos se realizaba mediante la microscopía electrónica de transmisión, sin embargo, en las últimas décadas se han desarrollado nuevas técnicas de tinción y se han aplicado técnicas histoquímicas de rutina, lo que ha permitido la identificación de esporas mediante la microscopía óptica.

Entre las tinciones de rutina que se han utilizado para la identificación de esporas de microsporidios se incluyen la hematoxilina-eosina, Gram, Giemsa, Warthin-Starry, entre otras (Franzen y Muller 1999, 2001, Franzen 2008). Sin embargo, son las tinciones que utilizan el cromotrope 2R como colorante base, las que han demostrado mayor utilidad en la detección de estos parásitos, principalmente en heces, orina y esputo.

La tinción de tricrómico modificado descrita por Weber y col. (Weber y col. 1992) mejoró la detección de esporas en heces y fluidos y supuso un gran salto cualitativo en la detección de estos parásitos. En esta técnica, se aumentó la concentración de cromotrope 2R (10 veces más que la usada en la tinción tricrómica), observándose las esporas de un color rosado claro sobre un fondo verde azul, con una pequeña línea central que corresponde al túbulo polar y/o un espacio que no se colorea (correspondiente a la vacuola posterior), características que confirman el diagnóstico de microsporidios (Weber y col. 1992). La desventaja de esta técnica es que es un procedimiento que consume mucho tiempo (90 minutos), por lo que se han descrito varias modificaciones que han permitido disminuir el tiempo de tinción, mejorar las características de tinción e incrementar el contraste entre las esporas y el fondo de la extensión. Estas variaciones incluyen el incremento en la temperatura del colorante, una disminución en la cantidad de ácido fosfotungstico y el uso de diferentes colorantes de contraste. Entre estas técnicas se pueden incluir la tinción de *quick-hot* gram-cromotrope (Moura y col. 1997) y la tinción de tricromico modificada por Ryan y col. (Ryan y col. 1993) (*Trichrome blue*). La tinción de *quick-hot* gram-cromotrope utiliza además del cromotrope, varios colorantes de la tinción de Gram, por lo tanto, las esporas se tiñen de violeta (gram positivos)

y muestran como mínimo uno de los rasgos estructurales característicos de los microsporidios (Moura y col. 1997). Presenta la ventaja de ser una prueba rápida (5 minutos), económica y sencilla y una sensibilidad y especificidad ligeramente superiores a las otras tinciones. En la tinción *Trichrome-Blue*, Ryan y col. disminuyeron la concentración de ácido fosfotúngstico y sustituyeron el verde brillante por azul de anilina como contracolorante (Ryan y col. 1993); de esta manera las esporas se observan de color rosa, con una estructura interna algo más oscura (probablemente el túbulo polar), sobre fondo azul.

También se han empleado en el diagnóstico de la microsporidiosis marcadores quimiofluorescentes como el blanco de calcofluor, Uvitex 2B y fungifluor. Estos compuestos tienen la propiedad de unirse a la quitina de la endospora de estos parásitos, permitiendo su detección rápida y fácil (se observan en forma de óvalos azul brillante sobre fondo oscuro) (Franzen y Muller 1999, 2001, Garcia 2002). Sin embargo, aunque se ha descrito una sensibilidad similar a las tinciones basadas en el cromotropo, se requiere un microscopio de fluorescencia y presenta la desventaja de que otras estructuras como hongos y bacterias, comunes en las heces, puedan presentar el mismo tamaño y afinidad por estos marcadores, aumentando la dificultad en la interpretación y dando lugar a falsos positivos. De acuerdo a esto, la mayoría de los autores concluyen que las dos tinciones deben usarse simultáneamente para tener una mayor seguridad en la detección del parásito, especialmente en infecciones leves con baja carga parasitaria.

Aunque el diagnóstico e identificación de los microsporidios se ha mejorado ostensiblemente, las principales desventajas de estos métodos es su baja sensibilidad y que mediante los mismos no se pueden diferenciar el género y especie de microsporidio implicado en la infección.

1.2.8.3 Técnicas Inmunológicas

1.2.8.3.1 Pruebas basadas en la detección de anticuerpos

Los métodos serológicos utilizados para la detección de anticuerpos anti-microsporidios (principalmente anti-*E. cuniculi*) incluyen el ELISA, inmunofluorescencia indirecta (IFI), fijación del complemento, contrainmunolectroforesis y *western blott*, entre otros (Garcia 2002). Estas técnicas requieren el uso de antígenos de microsporidios y por lo tanto se han desarrollado para la detección de anticuerpos de las especies que pueden cultivarse a largo plazo. Sin embargo, varios investigadores han diseñado proteínas recombinantes procedentes del túbulo polar o de la pared de la espora, para suplir los antígenos de aquellas especies que no se pueden cultivar con éxito (Garcia 2002).

La serología ha demostrado su utilidad en el diagnóstico de la microsporidiosis en animales, principalmente de infecciones causadas por *E. cuniculi*. En el caso de los humanos la utilidad de los métodos serológicos es reducida, teniendo en cuenta que aún no se ha establecido una correlación entre la producción de anticuerpos y la infección por estos parásitos y además se han descrito niveles variables de anticuerpos en individuos inmunocomprometidos (Garcia 2002, Franzen 2008, Anane y Attouchi 2010). En cuanto a las personas inmunocompetentes, la serología podría ser útil para esclarecer el diagnóstico cuando la eliminación de esporas ya sea en las heces o en la orina sea intermitente o la cantidad esté por debajo del límite de detección de los métodos directos, ya sean las tinciones o la PCR. Sin embargo, la utilidad de estos métodos se ve limitada por la aparición de nuevas especies de microsporidios que pueden infectar humanos y animales y por el hecho de que la microsporidiosis es mucho más frecuente en personas inmunocomprometidas, las cuales no producen niveles significativos de anticuerpos (Garcia 2002, Franzen 2008, Anane y Attouchi 2010).

La sensibilidad y especificidad de estos métodos no se conoce debido a que no hay estudios comparativos publicados al respecto. Aunque diversos estudios

han detectado anticuerpos anti-microsporidio tanto en pacientes VIH positivos como negativos y que las personas con sida pueden generar una respuesta humoral frente a estos parásitos, los métodos serológicos no son los más adecuados para el diagnóstico debido a que en dichos estudios se ha encontrado que al menos la mitad de los sueros de personas sin una historia de microsporidiosis tienen títulos positivos frente al parásito, lo que sugiere que los microsporidios (patógenos y no patógenos) pueden tener antígenos compartidos que producen reacciones cruzadas (Franzen y Muller 1999, 2001, Franzen 2008).

1.2.8.3.2 Pruebas basadas en la detección de antígenos

La IFI ha demostrado su utilidad en el diagnóstico de la microsporidiosis, mediante el uso de anticuerpos policlonales-AcPcs (purificados de sueros de animales y dirigidos frente a varios epitopos de proteínas) como monoclonales-AcMcs (purificados del sobrenadante de cultivos celulares). Se han generado un gran número de AcPcs y AcMcs frente a las especies de microsporidios más frecuentes en humanos, incluyendo *E. bienersi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi* y *E. hellem*, la mayoría de los cuales reaccionan con antígenos presentes en la pared de la espora o en el túbulo polar (Franzen y Muller 2001, Garcia 2002, Didier y Weiss 2008, Ghosh y Weiss 2009, Anane y Attouchi 2010).

La utilización de los AcPcs se ha restringido al diagnóstico a nivel de *Phylum*, teniendo en cuenta el alto grado de reacciones cruzadas documentadas entre *Encephalitozoon spp.* y otras especies de microsporidios, e incluso con antígenos de otros microorganismos incluyendo bacterias y hongos (Franzen y Muller 1999, 2001). Lo anterior, sumado a una sensibilidad menor a la observada con las tinciones tricrómica modificada y agentes quimiofluorescentes, han limitado el uso de los AcPcs como herramienta diagnóstica de rutina de la microsporidiosis, por lo que se ha sugerido su aplicación solo como prueba confirmatoria después de haberse realizado el diagnóstico inicial mediante otras técnicas (Garcia 2002).

Los AcMcs han mostrado ser de utilidad en la identificación específica de género y especie de los microsporidios, con una sensibilidad y especificidad comparables a las de la PCR (Garcia 2002, Franzen 2008, Anane y Attouchi 2010). Sin embargo, se han descrito evidencias de reacciones cruzadas utilizando AcMcs generados frente a una especie de microsporidio y a pesar de la variedad de AcMcs descritos en la literatura, la mayoría de estos no están disponibles comercialmente y se han generado principalmente frente a especies de *Encephalitozoon*, limitando el uso de estos métodos como herramienta diagnóstica de rutina de la microsporidiosis (Garcia 2002).

1.2.8.4 Técnicas Moleculares

Los métodos moleculares constituyen una herramienta valiosa para la detección, diferenciación de especie y genotipado de microsporidios a partir de diferentes muestras biológicas. Teniendo en cuenta que la identificación de especie de microsporidio es esencial para un rápido y adecuado tratamiento farmacológico, el uso de estos métodos ha aumentado y en la actualidad existen una gran variedad de técnicas moleculares para la detección de dichos parásitos (Ghosh y Weiss 2009). La principal ventaja de estos métodos radica en su alta sensibilidad y especificidad, y del hecho de no depender de la subjetividad del observador, como ocurre en los métodos basados en la microscopía. Adicionalmente, también se han aplicado otras tecnologías más sofisticadas como la PCR en tiempo real y las micromatrices de ADN las cuales se caracterizan por un mayor rendimiento y por permitir el análisis simultáneo de múltiples patógenos en diferentes muestras, así como también la determinación de la intensidad de la infección (Ghosh y Weiss 2009, Anane y Attouchi 2010). Aunque la reproducibilidad y aplicabilidad de estos métodos en la identificación de los microsporidios en muestras clínicas necesite de más estudios, es de esperar que estas tecnologías se adopten cada vez más como una herramienta diagnóstica de la microsporidiosis.

1.2.8.4.1 Hibridación *in situ* con fluorescencia-FISH

Una de las primeras técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos de microsporidios es el ensayo de hibridación *in situ* con fluorescencia (Fluorescence in situ hybridization-*FISH*). La FISH utiliza sondas de oligonucleótidos marcadas con un fluorocromo, que son complementarias a secuencias específicas de la subunidad pequeña del ARN ribosomal de microsporidios, permitiendo la identificación de especie (Hester y col. 2000, Graczyk y col. 2007). Esta técnica se desarrolló inicialmente para el diagnóstico de *E. hellem* (Hester y col. 2000), sin embargo el alineamiento de las secuencias del ARN ribosomal 16S de otras 22 especies de microsporidios permitió el diseño de sondas específicas para *E. intestinalis*, *E. bienewsi* y *E. cuniculi* (Graczyk y col. 2007). Aprovechando el uso de varios fluorocromos para el marcaje de las sondas, se han podido detectar simultáneamente esporas de estas 4 especies de microsporidios en muestras ambientales (Graczyk y col. 2007, Graczyk y col. 2007, Graczyk y col. 2007, Graczyk y col. 2009, Graczyk y col. 2010), de animales (Słodkiewicz-Kowalska y col. 2006) y humanos (Graczyk y col. 2007). La FISH múltiple ha demostrado ser una técnica fiable, que permite la cuantificación de esporas de microsporidios y por lo tanto es útil en la evaluación de la intensidad de la infección por estos parásitos, además de ser capaz de determinar la viabilidad de las esporas, lo que la convierte en un método valioso en estudios epidemiológicos ambientales.

1.2.8.4.2 PCR

La PCR es uno de los principales métodos moleculares utilizados para el diagnóstico de la microsporidiosis. Esta técnica es un método sensible, específico y reproducible en la identificación tanto de *Phylum* como de especie de los microsporidios, con un límite de detección de 10^2 esporas por gramo de materia fecal, mucho menor que la observada en la microscopía óptica (entre 10^4 a 10^6 esporas por gramo de materia fecal) (Franzen y Muller 1999, Garcia 2002, Ghosh y Weiss 2009, Anane y Attouchi 2010). Los métodos de PCR que se han descrito para el diagnóstico de la microsporidiosis generalmente utilizan cebadores que se unen principalmente a secuencias blanco de los genes del

ARN ribosomal de estos parásitos (Franzen y Muller 1999, Garcia 2002, Ghosh y Weiss 2009, Anane y Attouchi 2010). Una descripción extensa de estos cebadores puede encontrarse en las revisiones realizadas por Franzen y col. (Franzen y Muller 1999) y Ghosh y col. (Ghosh y Weiss 2009). Los principales cebadores utilizados en el diagnóstico de microsporidiosis en humanos son descritos en la Tabla 8. Algunos de estos cebadores son específicos de especie, mientras que otros solo amplifican especies de un género. El ADN de las esporas puede extraerse a partir de muestras clínicas que incluyen tejidos obtenidos por biopsia, lavado broncoalveolar, esputo, raspados corneales, aspirado duodenal y biliar, materia fecal y orina; como también de muestras ambientales o de las esporas obtenidas a partir de cultivos celulares, mediante ya sea kits de extracción comerciales, o por procedimientos de rutina como la digestión con proteinasa k seguido por una extracción con fenol cloroformo y precipitación con etanol (Franzen y Muller 1999, Garcia 2002, Ghosh y Weiss 2009, Anane y Attouchi 2010).

La PCR presenta la desventaja de ser una técnica costosa que requiere equipo especializado. Por otro lado, las muestras biológicas pueden tener muchos inhibidores de la polimerasa (especialmente la materia fecal y las muestras ambientales), por lo que se pueden generar falsos negativos, y teniendo en cuenta el grosor de la pared de la espora, se necesitan métodos de extracción agresivos para poder liberar el ADN del parásito.

Tabla 8. Principales cebadores utilizados en el diagnóstico de especies de microsporidios patógenas para humanos (Franzen y Muller 1999, Ghosh y Weiss 2009)

| Especie amplificada | Secuencia 5' – 3' | Nombre del cebador | Temperatura de alineamiento | Tamaño del producto amplificado (en pares de bases) |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------|
| Varias especies de microsporidios | AGGTTGATTCTGCCTGAC GCGCTGCTGCCRTCCT | MICF1 MICR1 | 56 | 300 a 400* |
| Varias especies de microsporidios | CACCAGGTTGATTCTGCCTGA TTATGATCCTGCTAATGGTTCTCCAAC | MicroF MicroR | 55 | 1300 |
| <i>Enterocytozoon bienewsi</i> y especies del género <i>Encephalitozoon</i> | CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC CCTCTCCGGAACCAACCTG | PMP1 (V1) PMP2 | 60 | Eb 250 Ec 268 Ei 270 Eh 279 |
| <i>Encephalitozoon intestinalis</i> | CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC CTCGCTCCTTTACACTCGAA | V1 Si500 | 58 | 375 |
| <i>Encephalitozoon intestinalis</i> | TTTCGAGTGTAAGGAGTCGA CCGTCCTCGTTCTCCTGCCCCG | SINTF1 SINTR | 55 | 520 |
| <i>Encephalitozoon cuniculi</i> | ATGAGAAGTGATGTGTGTGCG TGCCATGCACTCACAGGCATC | ECUNF ECUNR | 55 | 549 |
| <i>Encephalitozoon hellem</i> | TGAGAAGTAAGATGTTTAGCA GTAAAAAGACTCTCACACTCA | EHELF EHELRL | 55 | 547 |
| <i>Enterocytozoon bienewsi</i> | GAAACTTGTCCTACTCCTTACG CCATGCACCACTCCTGCCATT | EBIEF1 EBIER1 | 55 | 607 |
| <i>Enterocytozoon bienewsi</i> | CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC ACTCAGGTGTTATACTCACGTC | V1 EB450 | 48 | 353 |
| <i>Vittaforma corneae</i> | TGAGACGTGAAGATGAGTATC TCCCTGCCCACTGTCTCCAAT | NCORF1 NCORR1 | 55 | 375 |

* Dependiendo de la especie. Eb: *E. bienewsi*. Ec: *E. cuniculi*. Ei: *E. intestinalis*. Eh: *E. hellem*.

1.2.8.4.3 Otros métodos

Varios investigadores han publicado el uso de metodologías más sofisticadas basadas en la detección de ácidos nucleicos, incluyendo la PCR en tiempo real y micromatrices de ADN (Menotti y col. 2003, Menotti y col. 2003, Wang y col. 2005, Verweij y col. 2007). En los últimos años, la PCR cuantitativa, particularmente los procedimientos en tiempo real, han revolucionado el diagnóstico de ciertas enfermedades infecciosas, incluyendo la microsporidiosis. Esta técnica detecta los productos amplificados que se acumulan en tiempo real mediante el uso de fluorocromos o sondas marcadas con fluorocromos. Se han descrito protocolos que utilizan sondas específicas para el ADN de la subunidad pequeña del ARN ribosomal del género *Encephalitozoon* y específicas de las especies *E. cuniculi*, *E. hellem* y *E. intestinalis* (Hester y col. 2002, Wolk y col. 2002, Verweij y col. 2007); con niveles de detección entre 20 a 10^3 esporas por ml de suspensión de muestra. Además, también se han descrito protocolos de PCR en tiempo real múltiple, en los que se detectan simultáneamente la presencia de *E. bieneusi*, *E. cuniculi*, *E. hellem* y *E. intestinalis* a partir de heces frescas (Polley y col. 2011).

En pacientes con microsporidiosis, esta técnica permite una cuantificación de la carga parasitaria en diferentes muestras biológicas como heces, orina, esputo, sangre, suero y tejidos (Anane y Attouchi 2010). Con este método se puede hacer el seguimiento de la cinética de eliminación de esporas en pacientes que están bajo tratamiento, facilitando la evaluación de la eficacia del mismo. Además, permite el establecimiento de niveles de detección para resultados positivos, lo que facilita una interpretación más objetiva de los mismos, diferenciando la infección por el parásito de un portador asintomático. La PCR en tiempo real ofrece la ventaja adicional de eliminar los procedimientos posteriores a la PCR convencional, reduciendo el tiempo de reacción y manipulación de la muestra, y limitando el riesgo de contaminación y por ende los falsos positivos.

Otra de las técnicas moleculares aplicadas en la detección de microsporidios son las micromatrices de oligonucleótidos, que detectan simultáneamente *E. bienewisi*, *E. cuniculi*, *E. hellem* y *E. intestinalis* (Wang y col. 2005, Didier y Weiss 2008). Aunque inicialmente dicha metodología se desarrolló para el análisis de expresión génica, recientemente se ha aplicado para el diagnóstico molecular de estos parásitos. Sin embargo, la complejidad del método hace que su uso en el laboratorio clínico no sea de rutina, teniendo en cuenta que la producción de micromatrices, interpretación de los resultados, y diagnóstico final, requieren un equipo costoso y personal entrenado, que generalmente se encuentra en centros de genética altamente especializados (Wang y col. 2005).

1.2.8.5 Cultivo Celular

El cultivo celular no es una prueba recomendada para el diagnóstico de rutina de la microsporidiosis, ya que es una técnica laboriosa, costosa y lenta (el crecimiento de las esporas puede tomar entre 3 a 10 semanas), propensa a contaminarse con muestras que provienen de sitios que no son estériles (Visvesvara 2002). Sin embargo, aunque no se considera relevante en el diagnóstico, ha sido de gran utilidad en los estudios relacionados con la biología del parásito y su relación con la célula hospedadora, el desarrollo de anticuerpos para el diagnóstico clínico y la obtención de abundante material genómico para el análisis molecular de aislados clínicos. Además, ha demostrado ser valiosa en la evaluación de la eficacia de agentes antimicrobianos y desinfectantes sobre diferentes microsporidios incluyendo *E. cuniculi*, *E. hellem* y *E. intestinalis* (Garcia 2002). El cultivo *in vitro* se ha usado en combinación con análisis ultraestructurales, bioquímicos, antigénicos o moleculares para confirmar infecciones con especies existentes de microsporidios como también para definir nuevas especies (Franzen y Muller 1999, 2001).

1.2.9 Tratamiento

Se han propuesto varios esquemas de tratamiento para el manejo de la microsporidiosis, y la eficacia de los mismos ha sido variable dependiendo de la

especie asociada a la infección. Los criterios para un tratamiento exitoso incluyen la resolución de las manifestaciones clínicas y la ausencia del parásito en las muestras biológicas del paciente. En la actualidad, los fármacos que se utilizan para el tratamiento de la microsporidiosis en animales y humanos son el albendazol y la fumagilina (Didier y col. 2004, Anane y Attouchi 2010). Aunque se están investigando otras alternativas terapéuticas, desafortunadamente la mayoría de los estudios han llegado solo hasta la evaluación *in vitro* o *in vivo* de los fármacos, y no existen datos de ensayos clínicos en humanos. Además, las especies más frecuentemente evaluadas son las del género *Encephalitozoon* y *Vittaforma*, con muy pocos estudios con respecto a *E. bieneusi*.

1.2.9.1 Albendazol

El albendazol, un benzimidazol que inhibe la polimerización de la subunidad beta de la tubulina y tiene actividad antihelmíntica y antifúngica, es efectivo también frente a las especies del género *Encephalitozoon* (Didier y col. 1998, Anane y Attouchi 2010). El mecanismo de acción de este fármaco consiste en la inhibición de la división del microsporidio mediante el bloqueo de la síntesis de tubulina, uno de los principales componentes del huso mitótico (Didier y col. 1998, Anane y Attouchi 2010). Se ha probado su eficacia en estudios clínicos realizados en pacientes VIH positivos, en los cuales es el tratamiento de elección en los casos de microsporidiosis intestinal, ocular y diseminada (Anane y Attouchi 2010). En cuanto a *E. bieneusi*, el albendazol tiene muy poco efecto, ya que solo produce una disminución en la carga parasitaria y ciertas alteraciones de la espora, sin lograr la eliminación completa del parásito. Clínicamente, se produce una disminución en la frecuencia y el volumen de la diarrea, sin embargo, una vez se retira el fármaco, se pueden presentar recaídas. Por lo tanto, se considera que el albendazol tiene un efecto parasitostático sobre *E. bieneusi*, posiblemente por una inhibición parcial de la replicación (Anane y Attouchi 2010).

1.2.9.2 Fumagilina

La fumagilina es un antibiótico producido por el hongo *Aspergillus fumigatus*, cuyo blanco es la metionina aminopeptidasa 2 (MetAP2), una metaloproteasa indispensable para el metabolismo y supervivencia de los microsporidios (Anane y Attouchi 2010). Dicha enzima es esencial en la eliminación de la metionina del extremo terminal de las proteínas, lo cual es necesario para las modificaciones pos-traduccionales y funcionales. El mecanismo de acción del medicamento consiste en la inhibición de la replicación del parásito a través del bloqueo irreversible de la acción de la MetAP2 e inhibición de la síntesis de ARN (Anane y Attouchi 2010). La fumagilina es altamente efectiva cuando se utiliza en el tratamiento tópico de la queratoconjuntivitis causada por especies del género *Encephalitozoon* (Didier y Weiss 2008, Anane y Attouchi 2010). En los humanos, particularmente pacientes VIH positivos, este antibiótico ha permitido la resolución de la infección por *E. bienewisi* cuando se administra de forma sistémica en una dosis de 20 mg, 3 veces al día (Molina y col. 1997). También se ha descrito su efecto sobre *V. corneae in vitro* (Didier y col. 2006).

Sin embargo, la eficacia de la fumagilina puede verse contrarrestada por los efectos adversos derivados de su uso. Cuando se administra oralmente, el fármaco tiene toxicidad sobre la médula ósea por su efecto directo sobre la línea megacariocítica y los progenitores mieloides (Molina y col. 2002). La trombocitopenia y la neutropenia son las manifestaciones más comunes, por lo que se requiere una estricta vigilancia del paciente durante la administración del tratamiento.

1.2.9.3 Nitazoxanida

La nitazoxanida es un medicamento antiparasitario de amplio espectro utilizado frente a protozoos, nematodos, cestodos y trematodos (Anane y Attouchi 2010). Este medicamento inhibe la acción de la piruvato ferredoxina oxidoreductasa, involucrada en el sistema de transporte de electrones. Hasta el momento se ha descrito su eficacia *in vitro* frente a *E. intestinalis* y *V. corneae* (Didier y col. 1998), y ha probado su utilidad en el tratamiento de la

microsporidiosis por *E. bienewi* en pacientes VIH positivos (Bicart-See y col. 2000), por lo que se considera un fármaco prometedor en el tratamiento de esta parasitosis.

1.2.9.4 Terapia antirretroviral

La terapia antirretroviral permite la reconstitución del sistema inmune en los pacientes VIH positivos, gracias a la reducción en la carga viral y el aumento del número de linfocitos TCD4+. Consecuentemente, con la aplicación de dicha terapia se ha producido una disminución en la prevalencia de infecciones oportunistas, incluyendo la microsporidiosis; reduciendo a su vez la morbilidad relacionada con estas infecciones (Didier 2005, Anane y Attouchi 2010). Además, se ha demostrado que la terapia antirretroviral puede contribuir a la eliminación de microsporidios sin necesidad de un tratamiento específico y que reduce considerablemente el riesgo de recaídas por estos parásitos en pacientes inmunocomprometidos (Anane y Attouchi 2010).

1.2.9.5 Otros fármacos

Se han ensayado ciertos derivados benzimidazólicos diferentes al albendazol en el tratamiento de la microsporidiosis. Algunos han mostrado un efecto *in vitro* frente a *E. intestinalis*, pero tienen una absorción muy pobre cuando se administran por vía oral (mebendazol) o tienen efectos tóxicos que limitan su uso (nocodazol y parbendazol) (Anane y Attouchi 2010). Otros derivados como el tiabendazol se absorben bien, pero no son suficientemente efectivos frente al parásito. El febendazol y oxfendazol, son eficaces frente a *E. intestinalis* y en ensayos *in vitro* no han mostrado toxicidad, por lo que son medicamentos prometedores en el tratamiento de la microsporidiosis (Anane y Attouchi 2010).

Se han ensayado otros medicamentos para el tratamiento de la microsporidiosis con resultados variables y difíciles de reproducir incluyendo: la talidomida (Thalomid[®]), metronidazol (Flagyl[®]), atovaquone (Wellvone[®]), nifedipina (Adalate[®]), azitromicina (Zithromax[®]) y furazolidona (Furoxone[®]) (Anane y Attouchi 2010).

Otros fármacos se encuentran en periodo de evaluación y han demostrado ser eficaces en el control *in vitro* de diferentes especies, entre estos se encuentran el TNP-470 (Anane y Attouchi 2010); la ovalicina (Didier y col. 2006); las fluoroquinolonas (Anane y Attouchi 2010); antimicóticos (pancratistatina y 7-deoxynarciclasina) (Ouarzane-Amara y col. 2001); analogos de las poliaminas (Anane y Attouchi 2010); y el interferon gamma (Salat y col. 2008).

1.3 *Cryptosporidium* spp.

El género *Cryptosporidium* está compuesto por un grupo de protozoos intracelulares que infectan las células epiteliales del tracto gastrointestinal de todos los vertebrados (Fayer 2008). Este parásito se identificó por primera vez en 1907, cuando Ernest Edward Tyzzer describió la presencia del mismo en las glándulas gástricas de ratones (Xiao y col. 2004). En 1910, Tyzzer hace una descripción más detallada del parásito y propone el nombre de *Cryptosporidium* para el nuevo género *y muris*, como la especie. En 1912, este mismo investigador describe una nueva especie, *Cryptosporidium parvum*, que se diferenciaba de *C. muris* por infectar el intestino delgado de ratones y tener formas parasitarias más pequeñas (Xiao y col. 2004). Durante más de 60 años no hubo estudios que aportaran nueva información sobre este género, y sólo hasta 1976, dos grupos describieron por separado, los primeros casos de en humanos, en un niño inmunocompetente y un adulto inmunocomprometido con diarrea (Dillingham y col. 2002). En 1980 se pudo determinar que *Cryptosporidium* podía ser un agente común e incluso la causa primaria de epidemias como también de casos esporádicos de diarrea en una amplia variedad de mamíferos, confirmando de esta forma el potencial zoonótico de este protozoo. A partir de 1983, con la aparición del sida, el parásito emergió como agente causal de diarrea crónica y muchas veces fatal en dicha población, convirtiéndose en uno de los protozoos oportunistas más frecuentes. En 1993, *Cryptosporidium* es reconocido como una de las principales causas de diarrea asociada con el consumo de agua, debido al gran número de brotes que se han descrito a partir de esta fecha (Baldursson y Karanis 2011).

1.3.1 Taxonomía y filogenia

El género *Cryptosporidium* se encuentra incluido tradicionalmente dentro del *Phylum* Apicomplexa (posee un complejo apical), clase Sporozoasida (se reproduce por ciclos asexuales y sexuales, con formación de ooquistes), subclase Coccidiasina (ciclo de vida que incluye merogonia, gametogonia y esporogonia), orden Eucoocidiida (ocurre esquizogonia), suborden Eimeriina (hay formación de micro y magrogametos de forma independiente) y familia Cryptosporidiidae (contiene 4 esporozoitos desnudos en el citoplasma sin esporoquiste) (Ramírez y col. 2004).

A pesar de las similitudes en sus ciclos de vida, varias características distinguen al género *Cryptosporidium* del resto de los coccidios (Tabla 9). Adicionalmente, varios estudios moleculares basados en el análisis de las secuencias del ADN de la *SSU rRNA* y el gen de la β -tubulina, entre otros, demuestran que *Cryptosporidium* está estrechamente relacionado con el grupo de las gregarinas, con el que comparten además la presencia de estadios que crecen y se desarrollan fuera de la célula hospedadora (Hijjawi y col. 2002). Estos hallazgos sugieren la reclasificación de este género en un grupo taxonómico separado de los coccidios y cercano a las gregarinas (Carreno y col. 1999, Barta y Thompson 2006). De acuerdo a la última revisión de la clasificación de los eucariotas realizada por Adl y col. (Adl y col. 2012), *Cryptosporidium* ya se encuentra separado de los coccidios y se ubica en el supergrupo SAR (Stramenopiles, Alveolata, Rhizaria), dentro de los Alveolata, Apicomplexa y Conoidasida.

Tabla 9. Diferencias entre *Cryptosporidium* y los coccidios intestinales (Barta y Thompson 2006)

| Característica | <i>Cryptosporidium</i> | Otros coccidios |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------|
| Ubicación dentro de la célula hospedadora | Intracelular pero extra citoplasmático | Intracelular |
| Orgánulo de alimentación | Presente | Ausente |
| Tipos de ooquistes | Dos: de pared delgada y de pared gruesa | Uno: de pared gruesa |
| Tamaño de los ooquistes | Pequeños: (5–7,4 x 4,5–5,6 μm) | Grandes: (9–38 x 7–39 μm) |
| Esporoquistes, micropili y granulos polares en el ooquiste | Ausentes | Presentes |
| Desarrollo extracelular | Si | No |
| Apicoplasto | Ausente | Presente |
| Complejidad de las rutas metabólicas de biosíntesis | Simple, utiliza las de su hospedador | Más compleja |
| Especificidad de hospedador | Baja | Alta |

Tradicionalmente, las especies de *Cryptosporidium* se han clasificado de acuerdo a análisis morfométricos, caracterización genética, especificidad de hospedador y lugar de infección. Sin embargo, a pesar de los avances en la caracterización molecular de este parásito, no hay un acuerdo con respecto a la taxonomía de varias especies. Hasta el momento se han descrito 26 especies válidas (Tabla 10), 6 de las cuales están asociadas con enfermedades en humanos (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. felis* and *C. canis*), siendo *C. parvum* y *C. hominis* las especies más frecuentes (Chalmers y Katzer 2013).

Tabla 10. Especies del género *Cryptosporidium*

| Especie | Tamaño (µm) | Descubrimiento | | | Lugar de infección | Hospedador principal | Otros hospedadores |
|-----------------------|-------------|----------------|--------------------|--------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------|
| | | Año | Autor | Referencia | | | |
| <i>C. muris</i> | 7,0 x 5,0 | 1910 | Tyzzer | (Fayer 2008) | Estómago | Mamíferos: ratones y roedores silvestres | Humanos* |
| <i>C. parvum</i> | 5,0 x 4,5 | 1912 | Tyzzer | (Fayer 2008) | Intestino delgado | Mamíferos: ratones, ganado, cerdos, ovejas, cabras, humanos | |
| <i>C. meleagridis</i> | 5,2 x 4,6 | 1955 | Slavin y col. | (Fayer 2008) | Intestino | Pavos | Humanos |
| <i>C. wrairi</i> | 5,4 x 4,6 | 1971 | Vetterling y col. | (Fayer 2008) | Intestino delgado | Cerdo de guinea | |
| <i>C. serpentis</i> | 6,2 x 5,3 | 1977 | Brownstein y col. | (Fayer 2008) | Estómago | Serpientes | |
| <i>C. cuniculus</i> | 5,6 x 5,4 | 1979 | Inman and Takeuchi | (Fayer 2008) | Intestino | Conejos | Humanos |
| <i>C. felis</i> | 4,6 x 4,0 | 1979 | Iseki | (Fayer 2008) | Intestino delgado | Felinos | Humanos |
| <i>C. baileyi</i> | 6,2 x 4,6 | 1986 | Current y col. | (Fayer 2008) | Traquea, bolsa de Fabricio, cloaca | Aves gallináceas | Humanos* |
| <i>C. varanii</i> | 4,8 x 4,7 | 1995 | Pavlashek y col. | (Fayer 2008) | Intestino y cloaca | Lagartos y serpientes | |
| <i>C. galli</i> | 8,3 x 6,3 | 1999 | Pavlashek y col. | (Fayer 2008) | Proventrículo | Pollos | |
| <i>C. andersoni</i> | 7,4 x 5,5 | 2000 | Lindsay y col. | (Fayer 2008) | Estómago | Bovinos, camellos | Humanos* |
| <i>C. canis</i> | 5,0 x 4,7 | 2001 | Fayer y col. | (Fayer 2008) | Intestino delgado | Caninos | Humanos |
| <i>C. hominis</i> | 4,9 x 5,2 | 2002 | Morgan-Ryan y col. | (Fayer 2008) | Intestino delgado | Humanos | |

Introducción: continuación tabla 10

| Especie | Tamaño (µm) | Descubrimiento | | | Lugar de infección | Hospedador principal | Otros hospedadores |
|-----------------------|-------------|----------------|-------------------------------------|-----------------------|--------------------|---------------------------------------------|--------------------|
| | | Año | Autor | Referencia | | | |
| <i>C. molnari</i> | 4,7 x 4,5 | 2002 | Alvarez-Pellitero y Sitja-Bobadilla | (Fayer 2008) | Estómago | Peces | |
| <i>C. scophthalmi</i> | 4,4 x 3,9 | 2004 | Alvarez-Pellitero y col. | (Fayer 2008) | Intestino | Peces | |
| <i>C. suis</i> | 4,6 x 4,2 | 2004 | Ryan y col. | (Fayer 2008) | Intestino delgado | Cerdos | Humanos* |
| <i>C. bovis</i> | 4,9 x 4,6 | 2005 | Fayer y col. | (Fayer 2008) | Intestino delgado | Ganado vacuno, humanos | Humanos* |
| <i>C. fayeri</i> | 4,9 x 4,3 | 2008 | Ryan y col. | (Ryan y col. 2008) | Intestino delgado | Canguros | Humanos* |
| <i>C. fragile</i> | 6,2 x 5,5 | 2008 | Jirku y col. | (Jirku y col. 2008) | Estómago | Sapos | |
| <i>C. macropodum</i> | 5,4 x 4,9 | 2008 | Power y col. | (Power y Ryan 2008) | Desconocida | Canguros | |
| <i>C. ryanae</i> | 3,7 x 3,2 | 2008 | Fayer y col. | (Fayer y col. 2008) | Desconocida | Ganado vacuno | |
| <i>C. xiaoi</i> | 3,9 x 3,4 | 2009 | Fayer y Santin | (Fayer y Santin 2009) | Desconocida | Ovejas | |
| <i>C. ubiquitum</i> | 5,0 x 4,7 | 2010 | Fayer y col. | (Fayer y col. 2010) | Desconocida | Mamíferos: ganado, ovejas, cabras, roedores | Humanos* |
| <i>C. tyzzeri</i> | 4,6 x 4,2 | 2012 | Ren y col. | (Ren y col. 2012) | Intestino | Ratones | Humanos* |
| <i>C. viatorum</i> | 5,4 x 4,7 | 2012 | Elwin y col. | (Elwin y col. 2012) | Intestino | Humanos | |
| <i>C. scrofarum</i> | 5,2 x 4,8 | 2013 | Kvac y col. | (Kvac y col. 2013) | Intestino | Cerdos | Humanos* |

* Raramente asociado con criptosporidiosis humana y descripción de casos esporádicos.

1.3.2 Morfología

El ooquiste es la forma infectante y de resistencia de *Cryptosporidium*. Es el único estadio que se encuentra fuera del hospedador y que permite la diseminación de la infección. Este es esférico u ovoide y tiene un tamaño que varía entre 3 a 6 μm de diámetro. En su interior tiene 4 esporozoitos libres en el citoplasma y un cuerpo residual central (Ramirez y col. 2004). El cuerpo residual contiene elementos esenciales para la supervivencia del parásito, entre los que se incluyen una vacuola lipídica característica, inclusiones proteicas, ribosomas, citomembranas y gránulos de amilopectina, que están asociados con la nutrición de los esporozoitos (Fayer 2008). El ooquiste presenta una pared rica en puentes de disulfuro que le provee una barrera protectora a los esporozoitos. La pared es una estructura trilaminar que tiene en promedio un grosor de 49 nm. La capa externa está compuesta por glicoproteínas y tiene un grosor de tamaño irregular (con un promedio de 10 nm); esta puede ser parcialmente eliminada mediante el tratamiento con hipoclorito de sodio. La capa central, de 2,5 nm de espesor, tiene glicolípidos y glicoproteínas, lo que le confiere propiedades de ácido-alcohol resistencia. La capa interna, de composición glicoproteica, presenta 20 nm de espesor, esta le provee a la pared cierta rigidez y a la vez elasticidad. Una característica única que distingue al género es la presencia de una línea de sutura en la pared del ooquiste, la cual durante el desenquistamiento permite la salida de los esporozoitos (Fayer 2008).

El esporozoito de *Cryptosporidium* es similar al de los coccidios, presentando los orgánulos típicos del *Phylum* Apicomplexa (Figura 4). Es alargado y tiene forma de coma, con un extremo apical afinado y uno posterior redondeado. En el extremo anterior del esporozoito y de todos los estadios invasivos del parásito (zoitos), se presenta el complejo apical, responsable de la invasión de la célula hospedadora y supervivencia del parásito. Este complejo está compuesto por orgánulos secretores (roptrias, micronemas y gránulos densos) y componentes no vesiculares (anillo polar, conoide y microtúbulos subpelicales). Los micronemas, roptrias (una en el caso de *Cryptosporidium*) y gránulos densos

contienen una mezcla compleja de proteínas que son secretadas, ya sea en el extremo apical del zoíto o dentro de la célula, y cumplen funciones de adhesión, unión específica a la célula hospedadora, locomoción y formación de la vacuola parasitófora. El conoide es un cono de fibrillas que favorece la penetración de las células hospedadora; los microtúbulos están relacionados con la motilidad del parásito y los microporos participan en la ingestión de alimento durante la vida intracelular. En la parte posterior del esporozoito se encuentra un núcleo, aparato de Golgi, pequeños gránulos de amilopeptina y ribosomas. Posterior al núcleo hay un cuerpo cristalino cuyo origen y función se desconoce (Fayer 2008). Entre el cuerpo cristalino y el núcleo se encuentra un orgánulo de doble membrana, semejante a una mitocondria, que está rodeado por el retículo endoplásmico (Fayer 2008).

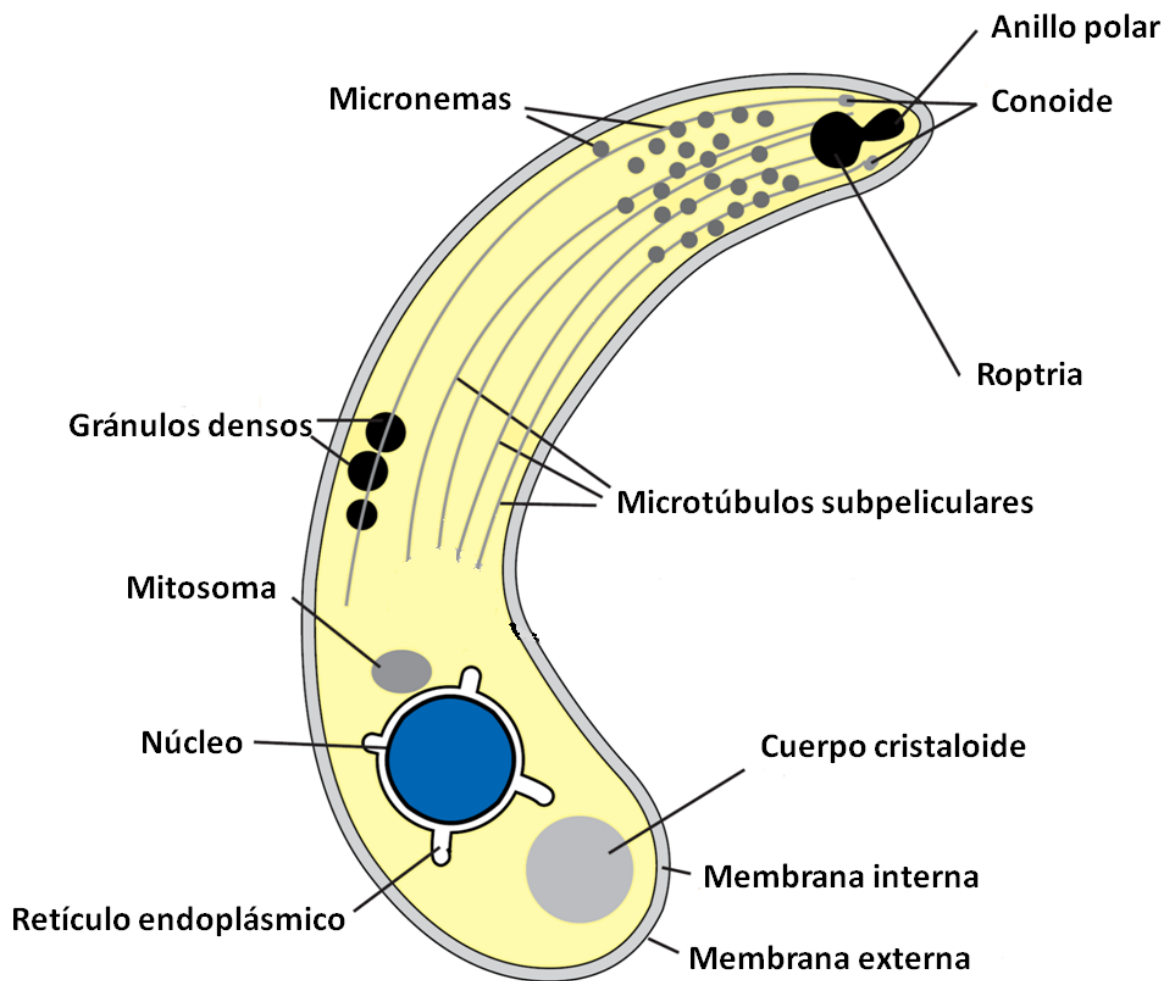


Figura 4. Esporozoito de *Cryptosporidium*. [Tomado, traducido y modificado de (Smith y col. 2005)]

1.3.3 Organización genómica

Hasta el momento solo se ha estudiado el genoma completo de 3 especies de *Cryptosporidium*: *C. parvum*, *C. hominis* y *C. muris* (Bankier y col. 2003, Abrahamsen y col. 2004, Xu y col. 2004, Widmer y Sullivan 2012), los cuales están disponibles en la base de datos CryptoDB (Heiges y col. 2006). Los genomas de *C. parvum* y *C. hominis* son genomas compactos de aproximadamente 9,2 Mpb distribuidas en 8 cromosomas. Ambas especies tienen un 95-97% de similitud en la secuencia de su ADN y su repertorio de genes es prácticamente idéntico, por lo que las diferencias fenotípicas entre ellas, tales como el rango de hospedadores, se deben probablemente a polimorfismos sutiles (diferencias en la longitud y número de repeticiones de micro y minisatélites) y a diferencias en la regulación de la expresión génica (Widmer y Sullivan 2012). No existen genomas extranucleares en estas especies. La comparación de los genomas de *C. parvum* y *C. hominis* con los genomas de otros apicomplexa y gregarinas, refleja una considerable reducción en el número de genes, número de intrones y longitud de las regiones intergénicas (Tabla 11) (Widmer y Sullivan 2012). De hecho, varios orgánulos (apicoplasto, mitocondrias), vías metabólicas (metabolismo del piruvato, isoprenoides, ácidos grasos, entre otras) y genes (que codifican para biosíntesis *de novo* de aminoácidos, nucleótidos y azúcares) presentes en los apicomplexa, están reducidos o ausentes en *Cryptosporidium*.

Estas especies también han ganado genes que garantizan la obtención de nutrientes a partir de la célula hospedadora, incluyendo una serie de genes que codifican para proteínas transportadoras de azúcares, aminoácidos y ácidos grasos (Abrahamsen y col. 2004, Xu y col. 2004). Al menos 31 genes se han adquirido probablemente por la transferencia a partir de otros orgánulos por vía intracelular o por transferencia horizontal a partir de bacterias (Widmer y Sullivan 2012), incluyendo algunos que no están presentes en otros apicomplexa, como los genes que codifican para las enzimas α -amilasa, inosina monofosfato deshidrogenasa y timidina quinasa.

Tabla 11. Características genómicas de varias especies de *Cryptosporidium*.

| | <i>C. parvum</i> | <i>C. hominis</i> | <i>C. muris</i> |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Tamaño del genoma (Mpb) | 9,1 | 9,2 | 9,2 |
| Contenido G+C (%) | 26 | 30 | 29 |
| Densidad génica (gen/Kpb) | 2305 | 2293 | 2337 |
| Número de genes con funciones asignadas | 3994 | 3952 | 3937 |
| Número de genes con función hipotética/desconocida | 43 | 60 | 55 |
| Promedio de distancia intergénica (pb) | 566 | 716 | * |
| Porcentaje de genes con intrones | 5 | 5–20 | 5 |
| Referencia bibliográfica | (Abrahamsen y col. 2004, Widmer y Sullivan 2012) | (Xu y col. 2004, Widmer y Sullivan 2012) | (Heiges y col. 2006, Widmer y Sullivan 2012) |

* Aun se desconoce.

En cuanto a *C. muris*, aunque esta especie tiene varias características que lo diferencian de *C. parvum* y *C. hominis* (hospedador, lugar de infección y tamaño de los ooquistes), su genoma es similar en cuanto al tamaño, composición de nucleótidos y contenido de genes (Widmer y Sullivan 2012) (Tabla 11). Se observan unas pocas pero notables excepciones; esta especie puede llevar a cabo la fosforilación oxidativa con una cadena respiratoria simple, ya que su genoma nuclear codifica para todas las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, incluyendo la ATP sintasa (Mogi y Kita 2010). De esta manera, *C. muris* está equipado para utilizar una gama más amplia de estrategias de metabolismo energético, contrario a lo que sucede en *C. parvum* y *C. hominis*.

1.3.4 Diversidad genética de *Cryptosporidium* spp.

Debido a su habilidad de infectar tanto a humanos como a una gran variedad de animales y a su ubicuidad en el ambiente, *Cryptosporidium* presenta múltiples vías de transmisión, cuya fuente pueden ser los humanos o tener un origen zoonótico (Fayer 2008). Los métodos moleculares se han utilizado en la identificación de las especies, genotipos y subtipos de *Cryptosporidium* (Fayer 2008) tanto en muestras clínicas como ambientales, y los datos aportados por estas técnicas han contribuido en el entendimiento de diferentes aspectos de la biología y epidemiología del parásito, incluyendo un mejor conocimiento de la estructura genética de sus especies, la asociación entre las diferentes poblaciones del parásito con la patogénesis y las manifestaciones clínicas y los riesgos de infección que cada especie/genotipo/subtipo pueda tener para los humanos (Fayer 2008, Kothavade 2012).

La determinación de los subtipos se utiliza con frecuencia en el estudio de la dinámica de transmisión de la criptosporidiosis en zona endémicas y en la identificación de las fuentes de contaminación asociadas con brotes epidémicos (Jex y Gasser 2010). Los marcadores de subtipo reflejan variaciones intragenotípicas, y la mayoría de los estudios se han hecho en *C. parvum* y *C. hominis*. El análisis de la secuencia del gen *gp60* (que codifica para la glicoproteína 60) es el método más utilizado en la identificación de subtipos de ambas especies, siendo, hasta el momento, el marcador más polimórfico identificado en el genoma. Este *locus* es útil para estos estudios, ya que presenta altas tasas de mutación, contiene regiones microsatelites muy variables (secuencias repetidas en tándem de trinucleótidos que codifican para la serina -TCA, TCG o TCT-) y también presenta variaciones en las secuencias de las regiones no repetidas, lo que aumenta su poder discriminatorio. Adicionalmente, se pueden establecer asociaciones entre los diferentes subtipos y ciertas propiedades biológicas del parásito y manifestaciones clínicas en el hospedador, ya que la proteína GP60 (también conocida como GP15/40), participa en la adhesión de los estadios invasivos del parásito a la célula

epitelial (Strong y col. 2000, Cama y col. 2007, O'Connor y col. 2007, Fayer 2008, Jex y Gasser 2010, Widmer y Sullivan 2012).

Mediante este marcador se clasifican los aislados de *C. parvum* y *C. hominis* en varias familias de subtipos, y dentro de cada familia, los subtipos se diferencian principalmente por el número de repeticiones de trinucleótidos (Xiao 2010). Las principales familias de subtipos y sus secuencias se describen en la Tabla 12.

Tabla 12. Principales familias de subtipos *gp60* (Soba y Logar 2008, Putignani y Menichella 2010, Xiao 2010, Imre y col. 2011, Widmer y Sullivan 2012)

| Especie | Familia | Trinucleótido repetido/ otras repeticiones | Subtipos (n) | Hospedadores y otras fuentes descritos |
|-------------------|------------------|--------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------|
| <i>C. hominis</i> | Ia | TCA/AA/GGACGGTGGTAAGG | 25 | Humanos ^a |
| | Ib | TCA, TCG, TCT | 12 | |
| | Id | TCA, TCG | 23 | |
| | Ie | TCA, TCG, TCT | 3 | |
| | If | TCA, TCG | 9 | |
| | Ig | TCA | 1 | |
| <i>C. parvum</i> | IIa | TCA, TCG/ACATCA | 50 | Humanos y animales (roedores, ciervos, cabras, ovejas y otros rumiantes) |
| | IIb | TCA | 2 | Humanos |
| | IIc | TCA, TCG | 1 | Humanos |
| | IId | TCA, TCG | 17 | (Humanos, bovinos, ovejas y cabras) |
| | IIE | TCA, TCG | 2 | Humanos |
| | IIf | TCA | 1 | Humanos |
| | IIg | TCA | 1 | Humanos |
| | IIh | TCA, TCG | 2 | Humanos |
| | IIi | TCA | 2 | Humanos |
| | IIk | TCA | 1 | Humanos |
| | III ^b | TCA | 5 | (Humanos y bovinos) |

^a Hay datos que sugieren la infección de bovinos por el subtipo IbA10G2R2, pero su potencial zoonótico está por confirmar.

^b También se conoce como IIj.

Cryptosporidium hominis tiene 6 familias de subtipos (Ia-Ig), siendo la familia Ib la más común y presentando una amplia distribución geográfica (Jex y Gasser 2010, Xiao 2010). Las familias Ia, Id e Ie se describen con menor frecuencia, y en muy raras ocasiones se encuentran los subtipos de las familias If e Ig. Dentro de la familia Ib, el subtipo IbA10G2R2 es el más prevalente, y se ha documentado en todos los continentes exceptuando América del sur. Este subtipo se ha detectado en la materia fecal del 44,5% de todos los casos de criptosporidiosis en humanos descritos hasta el momento; y está asociado con numerosos brotes epidémicos transmitidos por el agua o alimentos (Sulaiman y col. 2001, Jex y Gasser 2010). Adicionalmente, es el único subtipo de *C. hominis* para el que se ha sugerido la capacidad de infectar animales (Mallon y col. 2003), aunque faltan datos que corroboren la transmisión zoonótica del mismo. Aunque son menos frecuentes, las familias Ia e Id, tienen una mayor diversidad en sus subtipos (25 y 23 respectivamente), comparados con los 12 subtipos de la familia Ib (Jex y Gasser 2010). Los subtipos IaA12G1R1 e IdA15G1R1 son los más frecuentes en estas familias.

Cryptosporidium parvum tiene una mayor riqueza y diversidad en cuanto a las familias de subtipos *gp60* que *C. hominis* (11 versus 6, respectivamente) (Jex y Gasser 2010, Xiao 2010). La familia IIa es la más frecuente, y es la segunda familia más documentada en humanos, después de la Ib de *C. hominis*. Presenta una amplia distribución geográfica y una gran diversidad en cuanto al número de subtipos que la conforman (50 subtipos), siendo los subtipos IIaA16G2R1 y IIaA19G3R1 los más descritos. Estos se han encontrado tanto en humanos como en animales (roedores, ganado, ciervos, ovejas y otros rumiantes) indicando un potencial zoonótico (Jex y Gasser 2010). Otros subtipos menos frecuentes son el IIaA17G1R1 y IIaA18G2R1, que también se asocian con infecciones en humanos y animales (cerdos y caballos, entre otros). Las familias IIc y IId también son comunes, mientras que la IIb y IIe-k se describen muy poco. Un aspecto interesante de la familia IIc, es que se encuentra exclusivamente en humanos y solo tiene un subtipo (IIcA5G3R2); además muchos estudios han encontrado polimorfismos dentro de este subtipo,

pero en una región del gen *gp60* que se encuentra ubicada "aguas abajo" de las secuencias de microsatélite (Strong y col. 2000, Leav y col. 2002, Xiao y Ryan 2004, Sulaiman y col. 2005, Alves y col. 2006), con unas secuencias similares a la familia IIa de *C. parvum* y otras más parecidas a la familia Ib de *C. hominis*. Estos hallazgos han llevado a sugerir que la familia IIc puede subdividirse en dos subtipos (Strong y col. 2000). Desafortunadamente aun faltan estudios que identifiquen los subtipos *gp60* de ambas especies en diferentes zonas geográficas (la mayoría de los datos provienen de países desarrollados); animales diferentes a los rumiantes; y en personas tanto sintomáticas como asintomáticas, para establecer un patrón de comportamiento de los diferentes subtipos y no obtener datos sesgados.

La información generada por los genomas de *C. parvum* y *C. hominis* ha permitido la identificación de otras secuencias de microsatélites y minisatélites altamente polimórficas, que se usan en análisis de varios *loci* (en inglés MLT, *Multilocus typing*) para aumentar el poder discriminatorio en la identificación de los subtipos (Xiao 2010). El número de marcadores varía de 2 a 14 (Widmer y Sullivan 2012), sin embargo, son pocos los estudios que realizan este tipo de análisis, y aún no se han unificado los marcadores, por lo que los resultados obtenidos no son fáciles de comparar. La identificación de subtipos aplicando esta metodología se puede realizar mediante la detección de variaciones en la longitud de los fragmentos amplificados (MLT) ya sea por electroforesis en gel de poliacrilamida o mediante análisis por el programa GeneScan; o también a través del análisis de la heterogeneidad de las secuencias de los productos amplificados (*Multilocus sequence typing*-MLST) (Xiao 2010, Widmer y Sullivan 2012).

1.3.5 Ciclo de vida

El ciclo de vida de la mayoría de las especies de *Cryptosporidium* se completa en el tracto gastrointestinal (principalmente estomago e intestino delgado) del hospedador, con estadios de desarrollo que se encuentran asociados con la

superficie luminal de las células de la mucosa intestinal (Smith y col. 2005) (Figura 5).

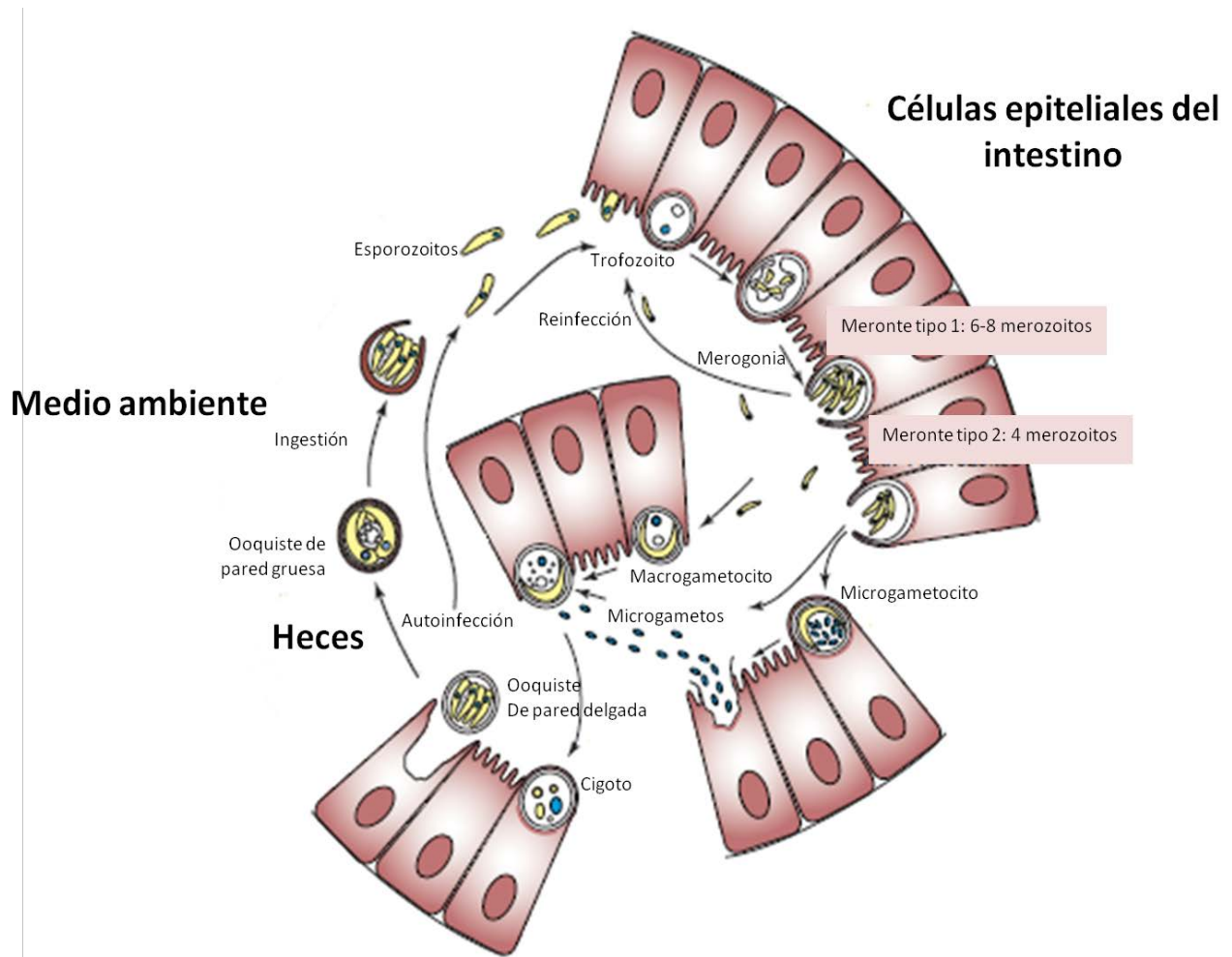


Figura 5. Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. Tomado, traducido y modificado de (Smith y col. 2005)

La fase endógena del ciclo de *Cryptosporidium* se inicia con la ingestión de los ooquistes y su fijación al epitelio gastrointestinal mediante moléculas de N-acetil-galactosamina presentes en su pared (Karanis y Aldeyarbi 2011). Posteriormente, los 4 esporozoitos escapan del interior de los ooquistes a través de una fisura que se abre en la pared de los mismos (Fayer 2008). Estudios *in vitro* demuestran que variaciones en el pH y temperatura, las sales biliares y las enzimas pancreáticas favorecen el desenquistamiento (Smith y col. 2005), probablemente al causar un aumento de la permeabilidad de la pared del ooquiste, movilidad de los esporozoitos dentro del ooquiste y la consecuente

exposición de receptores. Moléculas derivadas del parásito también participan en el proceso de desenquistamiento, entre las que se encuentran enzimas como la serina y cisteína proteasa, aminopeptidasas y fosfolipasa A2; proteínas de choque térmico, entre otros (O'Hara y Chen 2011).

Una vez se encuentran en un ambiente adecuado, los esporozoitos parasitan las células epiteliales del tracto gastrointestinal y/o sitios extra-intestinales utilizando un proceso activo, único entre los apicomplexa, denominado deslizamiento, el cual consiste en un movimiento circular y helicoidal, que le permite al esporozoito acercarse a la célula blanco (Karanis y Aldeyarbi 2011). El esporozoito se adhiere a receptores de la membrana de la célula epitelial mediante ligandos específicos presentes en su superficie, entre los que se encuentran el antígeno tipo circumsporozoíto (CSL), las glicoproteínas GP60 (GP 15/40), GP900, las proteínas relacionadas con la trombospondina (Thrombospondin-Related Anonymous Proteins-*TRAPs*) y CP47, entre otros (Chen y col. 2002, Dillingham y col. 2002, Tzipori y Ward 2002, Smith y col. 2005). Una vez el esporozoito se fija en la membrana apical de la célula epitelial, se induce una reorganización de la actina del citoesqueleto y la proyección de la membrana de esta célula alrededor del esporozoito; simultáneamente, proteínas secretadas por los micronemas y las roptrias, se fusionan con esta membrana, formando una vacuola parasitofora, en la cual el microorganismo permanece intracelular, pero extracitoplasmático. En la base de cada vacuola, una banda electrodensa (orgánulo de alimentación), compuesta por elementos del citoesqueleto de la célula hospedadora, facilita la toma de nutrientes por parte del parásito (Ramírez y col. 2004).

El esporozoito internalizado madura a trofozoito, el cual comienza un ciclo de multiplicación asexual (esquizogonia o merogonia) y luego continua con una multiplicación sexual (gametogonia) (O'Hara y Chen 2011) (Figura 5). El parásito sufre dos ciclos merogónicos; durante la primera merogonia se forman merontes tipo 1 que desarrollan de 6 a 8 merozoitos en su interior. El estadio de merozoito es estructuralmente similar al esporozoito. Después de la ruptura

del meronte, los merozoítos liberados ingresan en una nueva célula epitelial y pueden desarrollar en su interior un meronte tipo 1 (con 6-8 merozoitos) o tipo 2 (con 4 merozoitos) (O'Hara y Chen 2011). Los merozoitos liberados de la segunda merogonia parasitan nuevas células y se diferencian en macrogametocito (femenino) o microgametocito (masculino).

El macrogametocito evoluciona a macrogameto, el cual es inmóvil y permanece en el interior del enterocito. El macrogametocito se multiplica por fisión múltiple y desarrolla hasta 16 microgametos móviles que abandonan la célula parasitada en búsqueda del macrogameto (Karanis y Aldeyarbi 2011, O'Hara y Chen 2011). Una vez realizada la fertilización, se origina el cigoto (único estadio diploide dentro del ciclo del parásito), el cual sufre un proceso similar a la meiosis (esporogonia), generando 4 esporozoitos haploides que quedan contenidos en el interior de un ooquiste, que puede ser de pared delgada o de pared gruesa (O'Hara y Chen 2011).

El ciclo de autoinfección que se presenta en *Cryptosporidium* se da gracias a la producción indefinida de merozoitos tipo 1 como también a los ooquistes de pared delgada. Los ooquistes de pared gruesa se excretan en la materia fecal de los hospedadores infectados y representan la forma infectiva y de resistencia del parásito (Ramírez y col. 2004).

Es importante resaltar, que *Cryptosporidium*, además de tener estadios intracelulares durante su ciclo de vida, también puede presentar formas que crecen y se desarrollan por fuera de la célula hospedadora. En modelos experimentales *in vitro* se ha identificado la presencia de estadios similares a trofozoitos y gametos que se multiplican extracelularmente (Barta y Thompson 2006). Inclusive, se ha observado un tipo de asociación denominado sизigia, en el que dos gametos de diferente sexo se fusionan y se rodean por una cubierta protectora, transformándose en gametoquistes (Barta y Thompson 2006). Todas estas características las comparten con miembros del grupo de las

gregarinas, lo que refuerza la inclusión de *Cryptosporidium* en un taxón más cercano a estas.

1.3.6 Manifestaciones clínicas

En los humanos, el intestino delgado (íleo y yeyuno) es el lugar inicial de infección de *Cryptosporidium*. Los casos de criptosporidiosis se han descrito tanto en personas inmunocompetentes como inmunocomprometidas (O'Hara y Chen 2011). Las manifestaciones clínicas y duración de la enfermedad dependen de factores asociados al paciente, como la edad y el estado nutricional e inmune; como también de factores derivados del parásito, principalmente la virulencia de la cepa que causa la infección. La criptosporidiosis se asocia principalmente con una diarrea, usualmente voluminosa y acuosa, que puede estar acompañada de dolor abdominal. Algunas veces se puede observar moco, pero la sangre y los leucocitos son raros, debido a que se trata de una diarrea no inflamatoria. Se presentan, además, náuseas, vómitos, anorexia, pérdida de peso, fiebre, fatiga y problemas respiratorios. La diarrea puede evolucionar a un síndrome de mala absorción con pérdida de electrolitos, causando una deshidratación intensa que puede llevar en algunos casos a la muerte (Fayer 2008).

La mayoría de los casos en personas inmunocompetentes son esporádicos, siendo los niños (menores de 2 años) los más susceptibles a la infección (Fayer 2008). Esto probablemente se debe a la relativa inmadurez de su sistema inmune, a la falta de inmunidad por exposición previa, así como a una mayor probabilidad de transmisión fecal-oral en esta etapa de la vida. En personas inmunocompetentes, la infección es usualmente asintomática o autolimitada y puede persistir entre 9-15 días (O'Hara y Chen 2011), aunque algunos pueden permanecer sintomáticos durante varias semanas.

En las personas inmunocomprometidas, incluyendo pacientes con deficiencias inmunitarias relacionadas con la malnutrición, pacientes que reciben quimioterapia, y pacientes VIH-sida, la criptosporidiosis puede convertirse en

una enfermedad crónica que se prolonga durante meses y hasta años. En pacientes con sida, la criptosporidiosis puede ser extremadamente severa, y la mortalidad puede ser de hasta un 50% (Clark 1999, Chen y col. 2002, Ramirez y col. 2004). Dependiendo del lugar de infección y del número de células TCD4+, se pueden observar desde infecciones asintomáticas con eliminación de ooquistes hasta infecciones fulminantes similares al cólera (Tabla 13). Personas con células TCD4+ <50/ μ l desarrollan una enfermedad persistente, con diarrea profusa y devastadora, con una duración de varios meses hasta años, y en el peor de los casos, la mayoría de los pacientes no controlan la infección y mueren a causa de la misma (Clark 1999, Chen y col. 2002, Ramirez y col. 2004). Además, también se pueden presentar casos de criptosporidiosis extraintestinal, involucrando principalmente pulmones, tracto hepatobiliar y páncreas. Estos lugares probablemente representan extensiones de una infección primaria intestinal. La criptosporidiosis biliar es la manifestación extraintestinal más común y se ha descrito en un 26% de pacientes con sida e infección intestinal por *Cryptosporidium*. La diseminación al tracto respiratorio es rara, y se caracteriza por tos, disnea, fiebre y dolor torácico (Chen y col. 2002).

Tabla 13. Características clínicas de la criptosporidiosis (Chen y col. 2002)

| Característica | Personas inmunocompetentes | Personas inmunocomprometidas |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Población susceptible | Niños, especialmente menores de 1 año de edad y adultos de cualquier edad | Personas con sida, transplantados, personas sometidas a quimioterapia para cáncer |
| Lugar de infección | Usualmente intestinal | Intestinal o extraintestinal |
| Presentación entérica | Asintomática, aguda o persistente | Asintomática, transitoria, crónica y fulminante |
| Síntomas clínicos comunes | Diarrea, fiebre, dolor abdominal, vómito, náuseas y pérdida de peso | Diarrea, fiebre, dolor abdominal, vómito, náuseas y pérdida de peso. Manifestaciones extraintestinales dependiendo del sitio de infección |
| Duración clínica | Hasta 2 semanas | De 2 días hasta la muerte |
| Gravedad según el recuento de TCD4+ >200cel/ μ l <100cel/ μ l <50 cel/ μ l | | Resolución espontánea Infección crónica y extraintestinal Fulminante |
| Desarrollo de la infección | Alta mortalidad en recién nacidos y niños de países en desarrollo | Transitoria o asintomática , crónica o fulminante |
| Tratamiento | No requiere tratamiento específico | Terapia antirretroviral altamente activa sola o en combinación con agentes antiparasitarios |

1.3.7 Epidemiología

1.3.7.1 Distribución geográfica y prevalencia en humanos

La criptosporidiosis tiene una distribución cosmopolita, con casos descritos tanto en países desarrollados como en países en desarrollo. Si bien los primeros casos se describen en 1976, esta parasitosis adquirió verdadera importancia a partir de la aparición del sida, con un aumento considerable en el número de casos de criptosporidiosis en esta población (Fayer 2008). Posteriormente, el potencial de transmisión hídrica de este protozoo se confirmó en 1993, cuando se produjo en Milwaukee (USA) un brote epidémico de diarrea ocasionado por *Cryptosporidium* y que afectó más de 400.000 personas, incluyendo individuos inmunocomprometidos que desarrollaron formas graves de la infección (Mac Kenzie y col. 1994). Este brote está reconocido como uno de los más importantes relacionados con el agua, y se asoció con deficiencias en los procesos de filtración del agua destinada para el consumo (Mac Kenzie y col. 1994). Desde entonces, aparecen registrados casos de criptosporidiosis en más de 40 países, tanto en personas inmunocompetentes como inmunocomprometidas. Los datos de prevalencia de la criptosporidiosis en humanos varían dependiendo de factores que incluyen la zona geográfica estudiada (es más frecuente en países en desarrollo), el clima (es más común en climas tropicales) y la estación del año (se describen altas tasas durante la época lluviosa en muchos países tropicales), entre otros (Tzipori y Widmer 2008).

Los datos provenientes de pacientes con gastroenteritis reflejan una prevalencia de *Cryptosporidium* del 1 al 4% en Europa y América del norte y de un 3 al 20% en África, Asia, Australia, centro y sur de América (Medema y col. 2006). En personas inmunocompetentes sintomáticas se describe una prevalencia del 2,2% (con un rango entre 0,26 a 22%) en países desarrollados, siendo más frecuente en niños menores de 5 años y adultos jóvenes (Chen y col. 2002, Dillingham y col. 2002, Medema y col. 2006). En los países en desarrollo, se encuentra una prevalencia del 6,1% (con un rango entre 1,4 a 41%), principalmente en niños menores de 1 año, siendo rara su presencia en adultos

(Chen y col. 2002, Dillingham y col. 2002, Medema y col. 2006). En pacientes con sida y diarrea, la infección por este protozoo se ha encontrado en un 24% (con un rango entre 8,7 a 48%) en países en desarrollo y 14% (con un rango entre 6 a 70%) en países industrializados (Chen y col. 2002, Dillingham y col. 2002, Medema y col. 2006). La aplicación de la terapia antirretroviral y la implementación de nuevos métodos de tratamiento del agua de consumo (incluyendo la radiación ultravioleta y el tratamiento con ozono) han contribuido a disminuir el impacto de esta parasitosis en dichos países, por el contrario la criptosporidiosis sigue siendo un problema de salud pública en países en desarrollo (O'Hara y Chen 2011).

Estudios moleculares y epidemiológicos indican que de las 26 especies de *Cryptosporidium* descritas hasta la fecha, la gran mayoría de los casos en humanos están ocasionados por *C. parvum* y *C. hominis* (Kothavade 2012). *C. hominis* es más prevalente en América, Australia y África; siendo el responsable de la mayoría de los casos en humanos y causando una enfermedad aguda más severa que la observada en otras especies, con manifestaciones recurrentes y localizaciones extraintestinales (Leitch y He 2012). *C. parvum* es más frecuente en Europa, especialmente en el Reino Unido (Putignani y Menichella 2010). *C. meleagridis* es la tercera especie en importancia, encontrándose tanto en personas inmunocompetentes como inmunocomprometidas (Xiao y col. 2004). Esta especie es responsable del 1% de todas las infecciones por *Cryptosporidium* en Inglaterra; y en Perú y Haití, su prevalencia es tan alta como la de *C. parvum* (Putignani y Menichella 2010, Leitch y He 2012).

1.3.7.2 Fuentes de infección y modos de transmisión

Los ooquistes de *Cryptosporidium* se liberan en grandes cantidades en la materia fecal de humanos y bovinos infectados y sintomáticos ($>10^{10}$ por gramo de heces, durante infecciones agudas o crónicas), y en menor proporción en individuos asintomáticos y en otras especies de animales (Tzipori y Ward 2002). La transmisión del parásito es oro-fecal, ya sea directamente persona a persona o indirectamente a través del consumo de agua o alimentos

contaminados con ooquistes (Dillingham y col. 2002, Tzipori y Ward 2002, Leav y col. 2003, Monis y Thompson 2003, Ramirez y col. 2004). Los artrópodos pueden actuar como vectores mecánicos de la infección.

1.3.7.2.1 Potencial zoonótico

Cryptosporidium infecta un amplio rango de hospedadores vertebrados incluyendo mamíferos, roedores, aves, peces y reptiles (Fayer 2010) (Tabla 7), lo que facilita la contaminación ambiental y favorece la diseminación de este parásito. La transmisión zoonótica de *Cryptosporidium* puede ocurrir tanto por contacto directo con los animales como por la ingestión de agua o alimentos contaminados con la materia fecal de los mismos (Monis y Thompson 2003). *C. parvum* es la principal especie asociada con enfermedad en animales domésticos incluyendo bovinos, caballos, ovejas, cabras y cerdos (Tzipori y Ward 2002, Ramirez y col. 2004). Además también puede encontrarse en mascotas (perros y gatos) y animales silvestres, pero con una menor frecuencia y causando infecciones asintomáticas. El papel de dichos animales como fuentes potenciales para la criptosporidiosis humana aún se desconoce, teniendo en cuenta que la mayoría de las especies asociadas a estos, son específicas de su hospedador y hasta el momento no se han identificado en los humanos (Medema y col. 2006).

Otras especies de *Cryptosporidium* se han asociado con infecciones en humanos, incluyendo *C. canis*, *C. felis* y *C. meleagridis*, entre otras. Sin embargo, las rutas de infección en los casos descritos no se identificaron por lo que la transmisión a partir de sus hospedadores animales no pudo ser confirmada (Tzipori y Ward 2002, Ramirez y col. 2004, Caccio y col. 2005). Por ello, en la actualidad se necesitan más estudios que caractericen los aislados encontrados en animales y en humanos para poder verificar la transmisión zoonótica de estas especies.

1.3.7.2.2 Transmisión hídrica

El agua es una de las principales fuentes de infección para *Cryptosporidium*, el cual está considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un patógeno de referencia para la evaluación de la calidad del agua potable (Medema y col. 2006). La transmisión hídrica de este protozoo se asocia con ciertas características biológicas y epidemiológicas del parásito que facilitan la supervivencia de los ooquistes durante largos periodos en el ambiente y su diseminación a través del agua (Carey y col. 2004, Fayer 2004, Smith y Nichols 2010). *Cryptosporidium* puede completar su ciclo de vida en un solo hospedador, el cual elimina los ooquistes inmediatamente infectantes en materia fecal; y en el caso de ser una infección sintomática, se excretan de manera continua grandes cantidades de ooquistes, contribuyendo a la contaminación ambiental (Carey y col. 2004, Fayer 2004, Smith y Nichols 2010). Adicionalmente, de acuerdo a extrapolaciones realizadas a partir de datos obtenidos en la epidemia de Milwaukee, *Cryptosporidium* es capaz de causar infección con dosis muy bajas (1 a 10 ooquistes), lo que facilita la adquisición de la enfermedad por hospedadores susceptibles y por tanto, prolonga el ciclo de transmisión de este protozoo (Carey y col. 2004). El reducido tamaño de sus ooquistes (entre 4 a 6 μm para la mayoría de las especies que infectan a humanos), permite que *Cryptosporidium* escape a los sistemas de filtración utilizados en las plantas potabilizadoras; y la naturaleza robusta de su pared está asociada con la alta resistencia que *Cryptosporidium* presenta a los desinfectantes que se usan comúnmente en la industria del agua (Carey y col. 2004).

La eliminación de *Cryptosporidium* de las aguas constituye un desafío permanente para las plantas de tratamiento, aún en países con tecnología avanzada. Los procedimientos convencionales de tratamiento de agua tales como la coagulación, floculación, sedimentación, filtración y desinfección con químicos, no han demostrado ser completamente exitosos en la eliminación o inactivación de este parásito (Betancourt y Rose 2004, Fayer 2008).

Con los desinfectantes comunes solo se logra reducir significativamente la infectividad de los ooquistes aplicando altas concentraciones que pueden llegar a ser tóxicas, requiriendo un tiempo de exposición demasiado largo y en muchas ocasiones a temperaturas elevadas. El cloro, eficaz contra muchos microorganismos, es incapaz de inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium*, incluso cuando se usa a altas concentraciones y durante largos periodos, por lo que su utilidad en las plantas de tratamiento de aguas y piscinas es muy limitada (Carey y col. 2004, Fayer 2008). Del mismo modo, se ha descrito que la floculación con sales de aluminio, un procedimiento frecuente en las plantas de tratamiento, no tiene ningún impacto en la viabilidad de los ooquistes, mientras que con altas concentraciones de sulfato de calcio o sulfato férrico, se ha observado una reducción significativa de la viabilidad, pero con niveles altos de pH y durante un tiempo prolongado (Fayer 2008).

Teniendo en cuenta lo anterior, *Cryptosporidium* se considera como una gran amenaza para los sistemas de distribución de agua, lo que ha llevado a la realización de estudios para determinar nuevos compuestos o tratamientos efectivos frente al parásito. Desafortunadamente entre los desinfectantes que han probado ser más eficaces se encuentran compuestos de bajo peso molecular como el amoníaco, Oxido de etileno, Bromuro de metilo y el ozono, los cuales presentan una alta toxicidad y con excepción de este último, no son aptos para su uso en el tratamiento del agua (Fayer 2008). El ozono se utiliza actualmente en el tratamiento del agua, principalmente en Europa; sin embargo, su aplicación como desinfectante primario no es tan frecuente, ya que se emplea mas como un agente oxidante y en el control de los problemas de sabor y olor del agua (Carey y col. 2004). Otros estudios describen un mayor grado de desinfección mediante el uso de múltiples compuestos químicos tales como el cloro y las cloraminas o el ozono y las cloraminas, comparado con el efecto de un solo desinfectante (Fayer 2004).

El tratamiento con luz ultravioleta es uno de los métodos físicos que se tienen como alternativa valiosa en la inactivación de los ooquistes de *Cryptosporidium*

(Betancourt y Rose 2004, Carey y col. 2004, Fayer 2008). Los procesos de filtración también son fundamentales en la eliminación del parásito, lo que ha llevado al establecimiento de nuevas tecnologías que mejoren su eliminación, incluyendo la microfiltración, ultrafiltración y ósmosis reversa, entre otros (Betancourt y Rose 2004, Fayer 2008). El inconveniente para la implementación de estas tecnologías es el alto coste de su instalación y mantenimiento.

La turbidez del agua es uno de los parámetros que se tienen en cuenta para evaluar la calidad de la misma y el riesgo de contaminación microbiana; sin embargo, varios estudios demuestran que la reducción en los niveles de la misma no garantiza la ausencia de *Cryptosporidium*. Estudios efectuados sobre 82 plantas potabilizadoras de aguas superficiales de Estados Unidos, encontraron muestras positivas de *Cryptosporidium* en 22 de ellas, y en más del 70% de las mismas, la turbidez del agua era inferior a 0,1 NTU, y en el 20 % menor a 0,05 NTU (Carey y col. 2004). Adicionalmente, en muchos de los brotes de criptosporidiosis relacionados con el agua, los niveles de turbidez se encuentran en los límites establecidos por las entidades gubernamentales.

Se han publicado en todo el mundo un gran número de brotes de criptosporidiosis asociados con la transmisión hídrica, involucrando tanto aguas de consumo como aguas recreacionales (Karanis y col. 2007, Baldursson y Karanis 2011). De acuerdo a una investigación realizada por Karanis y col. (Karanis y col. 2007), de los 325 brotes descritos hasta 2004 a nivel mundial y causados por protozoos, *Cryptosporidium* fue el responsable de un 50,8% de dichos brotes. Baldursson y col. (Baldursson y Karanis 2011) describieron 199 brotes ocurridos entre 2004 y 2010, y nuevamente *Cryptosporidium* fue el agente protozoario más frecuentemente implicado, con cerca de un 60% (120 de los 199 brotes). Estos brotes se relacionaron con deficiencias en los tratamientos utilizados en las plantas potabilizadoras y en las piscinas, fallas en los sistemas de abastecimiento del agua, contaminación de aguas superficiales y subterráneas y consumo de agua no tratada (Medema y col. 2006, Baldursson y Karanis 2011).

Cryptosporidium parvum y *C. hominis* fueron las especies más frecuentemente implicadas como agentes etiológicos de los brotes, en la mayoría de los casos se identificó solo una especie, y en raras ocasiones ambas especies se asociaron con el brote (Medema y col. 2006). En cuanto a su distribución geográfica, un gran número de los brotes se concentran en Estados Unidos, Canadá, Australia y Europa (principalmente en el Reino Unido e Irlanda) (Smith y col. 2006). Ello puede deberse a la implementación de sistemas de vigilancia en estos países, en los cuales se realiza el seguimiento e investigación de los casos y brotes causados por el parásito (Chalmers 2012).

En España se identificaron 13 brotes de criptosporidiosis entre 1995 y 2011, en 7 de los cuales se confirmó el agua como la fuente de infección (Perez y col. 2000, Rodriguez-Salinas y col. 2000, Smerdon 2000, Galmes y col. 2003, Tello y Rodriguez 2003, Ortega y col. 2006, Artieda y col. 2012). De los brotes notificados, se destaca por su magnitud y por las implicaciones internacionales, el ocurrido en Baleares, que afectó a 391 turistas británicos, con una piscina como fuente de infección (Tello y Rodriguez 2003).

Numerosos estudios también han demostrado la presencia de *Cryptosporidium* en diferentes tipos de agua, y algunos, incluso han podido determinar la especie/genotipo y subtipo del parásito (Putignani y Menichella 2010, Smith y Nichols 2010). En Europa, además de *C. parvum* y *C. hominis*, también se han identificado otras especies de *Cryptosporidium* en agua, las cuales se encuentran causando con menor frecuencia infecciones en humanos, y entre las que se incluyen *C. meleagridis*, *C. muris* y *C. andersoni* y *C. baileyi* (Putignani y Menichella 2010, Smith y Nichols 2010). En España, varios estudios han descrito la presencia de *Cryptosporidium* spp. en muestras ambientales, que incluyen agua potable (Castro-Hermida y col. 2008, Castro-Hermida y col. 2010, Castro-Hermida y col. 2011), aguas residuales (Castro-Hermida y col. 2008, Castro-Hermida y col. 2010, Alonso y col. 2011, Castro-Hermida y col. 2011), aguas recreacionales (Castro-Hermida y col. 2008, Castro-Hermida y col. 2010) y superficiales (Castro-Hermida y col. 2009), como también en lodos y

biosólidos (Guzman y col. 2007, Reinoso y Becares 2008, Alonso y col. 2011). Sin embargo, solo en algunos de estos estudios se ha identificado la especie de *Cryptosporidium* (Tabla 13).

Tabla 14. Especies de *Cryptosporidium* descritas en aguas de España.

| Especie de <i>Cryptosporidium</i> | Origen | Procedencia geográfica | Referencia bibliográfica |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <i>C. muris</i> | Efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales | Galicia | (Gomez-Couso y col. 2006, Navarro-i-Martinez y col. 2011) |
| <i>C. baileyi</i> | Aguas residuales | Galicia | (Gomez-Couso y col. 2006, Navarro-i-Martinez y col. 2011) |
| <i>C. parvum</i> <i>C. hominis</i> <i>C. andersoni</i> | Afluentes y efluentes de plantas potabilizadoras | Galicia | (Castro-Hermida y col. 2008, Navarro-i-Martinez y col. 2011) |
| <i>C. parvum</i> <i>C. hominis</i> <i>C. andersoni</i> | Afluentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales | Galicia | (Castro-Hermida y col. 2008, Navarro-i-Martinez y col. 2011) |
| <i>C. parvum</i> <i>C. hominis</i> <i>C. andersoni</i> | Río Tambre y afluentes | Galicia | (Castro-Hermida y col. 2009, Navarro-i-Martinez y col. 2011) |
| <i>C. parvum</i> <i>C. hominis</i> <i>C. andersoni</i> | Aguas residuales y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales | Galicia | (Castro-Hermida y col. 2011, Navarro-i-Martinez y col. 2011) |

1.3.7.2.2.1 Método 1623

Aunque no existe una metodología unificada para la detección de *Cryptosporidium* en agua, el método 1623 (EPA 2005), es uno de los más empleados a nivel mundial en la evaluación tanto de *Cryptosporidium* como de *Giardia* (Jiang y col. 2005, Castro-Hermida y col. 2008, Almeida y col. 2010, Almeida y col. 2010, Feng y col. 2011). Dicho método utiliza filtros comerciales (IDEXX Filta-Max, Envirocheck HV) que están diseñados para una rápida captura y recuperación de los ooquistes y quistes de los parásitos. En el caso del sistema IDEXX Filta-Max, consiste de un modulo que contiene múltiples capas de discos de espuma que están comprimidos para crear un filtro con un tamaño de poro (3-18 μm) que atrapa eficazmente los ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* (EPA 2005). Una vez se toma la muestra, los filtros se lavan con una solución detergente y el material eluido se concentra mediante centrifugación.

Los ooquistes y quistes presentes en la muestra concentrada se purifican mediante separación inmunomagnética y la detección de los mismos se realiza por microscopía de fluorescencia, utilizando anticuerpos monoclonales marcados con ITFC; este paso previo de purificación mejora la observación de los parásitos y permite diferenciarlos de los materiales inespecíficos y algas microscópicas (microalgas) que se encuentran con mucha frecuencia en las muestras de agua. La confirmación de las formas parasitarias aisladas se lleva a cabo mediante microscopía por contraste de fases o también por microscopía de interferencia diferencial, mediante la visualización de la morfología y estructuras internas de los ooquistes y quistes, tales como esporozoitos (*Cryptosporidium*) y axonema y núcleos (*Giardia*) (EPA 2005). Para ello se utiliza el colorante fluorescente DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), que tiñe selectivamente las regiones del ADN ricas en adenina y timina, permitiendo distinguir, en el caso de *Cryptosporidium*, los ooquistes esporulados potencialmente viables. Para confirmar la viabilidad se pueden utilizar colorantes vitales como el Ioduro de propidio, el cual penetra el interior de las

células únicamente cuando la continuidad de las barreras físicas (pared celular y membrana celular) han sido interrumpidas.

Otros autores han mejorado la sensibilidad en la detección del parásito mediante la combinación del sistema de filtración, concentración y purificación descrito en el método 1623 con la aplicación de métodos moleculares como la PCR para la identificación de este protozoo (Jiang y col. 2005).

El porcentaje de recuperación de los parásitos depende del método de recolección; volumen de muestra; sistema de filtración y tipo de membrana utilizado; y del método de detección empleado. Así mismo el tipo de agua evaluada influye considerablemente en la eficiencia de la recuperación, ya que se describen porcentajes más altos en aguas tratadas o provenientes de grifo comparado con las aguas afluentes de plantas potabilizadoras y aguas residuales (Hsu y col. 2001, McCuin y Clancy 2003, EPA 2005, Smith y Nichols 2010).

Existen variaciones de los métodos 1622 y 1623 que incluyen procedimientos alternativos de recolección, filtración, purificación y detección. Sin embargo, a diferencia de los primeros, para los cuales se estableció un proceso de validación riguroso con la participación de varios laboratorios, los métodos alternativos se han usado en laboratorios específicos, por lo que se requieren más estudios que validen su utilidad y permitan su comparación con los protocolos ya establecidos.

1.3.7.2.3 Transmisión a través de alimentos

Aunque el número de brotes de criptosporidiosis que se relacionan con el consumo de alimentos no es tan alto como el asociado al agua, este tipo de transmisión se ha confirmado a nivel mundial (Smith y Nichols 2010, Robertson y Chalmers 2013). Antes del año 2000, se documentaron únicamente 5 brotes de criptosporidiosis transmitidos por alimentos, la mayoría de los cuales se presentaron en Estados Unidos y el Reino Unido. Posteriormente se

describieron 8 nuevos brotes que presentaban una distribución geográfica más amplia, incluyendo Australia, Japón, y países nórdicos de Europa (Robertson y Chalmers 2013). Entre los alimentos asociados a dichos brotes se encuentran los vegetales y frutas, mariscos, carne cruda, bebidas frías y alimentos a base de agua contaminada, leche cruda y productos lácteos, sidra de manzana de fabricación casera, entre otros. Generalmente la contaminación de los alimentos se da a través de los manipuladores de alimentos, la irrigación con agua contaminada, o el contacto con materia fecal de animales infectados (Smith y Nichols 2010, Robertson y Chalmers 2013).

1.3.8 Diagnóstico

El diagnóstico de la criptosporidiosis debe considerarse en personas con diarrea aguda o persistente, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Chen y col. 2002). En general, el diagnóstico se realiza mediante métodos directos que detectan los ooquistes del parásito en la materia fecal o tejidos. Los métodos de tinción son los más utilizados, y hay una variedad de protocolos útiles en la identificación del parásito, los cuales aprovechan las propiedades de ácido-alcohol resistencia de los ooquistes, y entre los que se incluyen la tinción de Kinyoun (ácido-alcohol resistente modificado) y safranina modificada (Fayer 2008). Estas técnicas consumen tiempo, varían en sensibilidad y especificidad y deben realizarse por personal entrenado en el diagnóstico microscópico; sin embargo, presentan la ventaja de tener un bajo costo. Debido a que la excreción de ooquistes puede ser intermitente, deben analizarse al menos dos muestras independientes de materia fecal para disminuir la probabilidad de falsos negativos.

Se han desarrollado diversas técnicas inmunológicas para el diagnóstico de *Cryptosporidium*, y aunque su sensibilidad y especificidad es más alta, son más costosas que los métodos convencionales de tinción (Clark 1999). La inmunofluorescencia directa y el Enzimoimmunoensayo (EIA) son útiles en la detección de antígenos del parásito, y actualmente existen en el mercado varias pruebas comerciales basadas en estas técnicas. Debido a que hasta el

momento no se han producido anticuerpos específicos para cada especie, solo se puede hacer el diagnóstico de género (Fayer 2008).

Existen varias pruebas inmunocromatográficas disponibles comercialmente para el diagnóstico de *Cryptosporidium* (ColorPAC de Becton Dickinson, Diagnostic Triage Parasite panel de BIOSITE, entre otras), estas son técnicas simples que requieren mínimo entrenamiento, y son muy útiles en el diagnóstico de campo de este parásito (Clark 1999). Aunque no reemplazan los métodos de rutina, su alta sensibilidad y especificidad sugiere que pueden ser útiles para confirmar la infección por *Cryptosporidium* en pacientes con bajo número de parásitos (Fayer 2008).

Las herramientas moleculares son específicas y altamente sensibles en el diagnóstico de la criptosporidiosis, permiten la identificación del parásito a nivel de especie, genotipo y subtipo, y son muy útiles en la identificación de las fuentes de infección de este protozoo (Skotarczak 2010). Sin embargo, su uso sigue estando restringido a los laboratorios especializados. La muestra principal es la materia fecal, aunque se pueden procesar muestras de esputo, bilis, tejidos y muestras ambientales (Fayer 2008). Generalmente se utilizan protocolos que combinan la PCR con el análisis de RFLP y el análisis de secuencia (Ramirez y col. 2004). Las secuencias blanco incluyen los genes que codifican para la *SSU rRNA*, las proteínas de la pared del ooquiste (COWP), β -tubulina, TRAP-C1, TRAP-C2, proteínas de choque térmico (HSP70), glicoproteína GP60 y dihidrofolato reductasa (DHFR), entre otros (Xiao 2010).

Una de las dificultades que se presentan en la detección de *Cryptosporidium* por métodos moleculares, es la extracción del ADN a partir de los esporozoitos contenidos en los ooquistes de pared gruesa (Skotarczak 2010). Hasta el momento no existe un método recomendado; generalmente se utilizan procedimientos mecánicos (agitación con perlas de vidrio o zirconio) o químicos (enzimas y tampones de lisis), ciclos de congelación/descongelación, tratamientos con calor, o la combinación de estos, para romper la pared de los

ooquistes y liberar el ADN (Fayer 2008). Estos protocolos pueden realizarse ya sea con ooquistes previamente purificados mediante flotación, sedimentación o separación inmunomagnética; o bien a partir de la muestra sin purificar (Fayer 2008).

Además de la PCR, también se han descrito otras herramientas moleculares útiles en la detección del parásito, incluyendo la PCR en tiempo real, PCR en tiempo real múltiple, FISH, el ensayo de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (Loop-mediated isothermal amplification-*LAMP*) y las micromatrices de ADN (Skotarczak 2010). El método de FISH se ha empleado en la detección de *Cryptosporidium* tanto en muestras clínicas como ambientales (Vesey y col. 1998, Lemos y col. 2005, Alagappan y col. 2008, Alagappan y col. 2009, Cheng y col. 2009). La mayoría de los protocolos utilizan sondas que se unen a regiones específicas del ADN de la *SSU rRNA*, y solo algunos son capaces de diferenciar las especies del parásito, específicamente *C. parvum* y *C. hominis* (Alagappan y col. 2008, Alagappan y col. 2009). Esta técnica presenta la ventaja de ser capaz de determinar la viabilidad de los ooquistes presentes en la muestra, por lo que puede ser de gran utilidad en las muestras ambientales.

La PCR en tiempo real permite el diagnóstico tanto de pacientes sintomáticos como de portadores asintomáticos, debido a su alta sensibilidad (puede llegar a detectar hasta 3 ooquistes) (Skotarczak 2010). Sin embargo, la mayoría de los protocolos descritos hasta el momento solo identifican las especies más frecuentes en humanos, *C. parvum* y *C. hominis*, llegando solo hasta la definición de género cuando otras especies se encuentran en la muestra. Las secuencias blanco más comunes incluyen los genes que codifican para la *SSU rRNA*, *cowp*, *hsp70*, *actina* y *LIB13*, un gen que codifica para una proteína de función desconocida (Higgins y col. 2001, Limor y col. 2002, Guy y col. 2003, Di Giovanni y LeChevallier 2005, Hadfield y col. 2011, Homem y col. 2012). También existen protocolos de PCR en tiempo real que detectan simultáneamente *Cryptosporidium* y otros patógenos entéricos en muestras clínicas (Skotarczak 2010).

Se han desarrollado varios métodos LAMP para la identificación de protozoos, incluyendo *Cryptosporidium*, usando como secuencias blanco el gen *gp60* y *hsp70* (Karanis y col. 2007, Bakheit y col. 2008). Este método está basado en el principio de síntesis de ADN por desplazamiento de cadena, el cual se lleva a cabo por una polimerasa con alta actividad de desplazamiento de cadena y un sistema de dos cebadores internos y dos cebadores externos para reconocer un total de seis secuencias distintas en el ADN blanco (Parida y col. 2008). Es un método de amplificación único, extremadamente específico y sensible, capaz de discriminar diferencias de un solo nucleótido (Parida y col. 2008). Esta técnica presenta la ventaja de producir grandes cantidades de producto amplificado, no requiere de termociclador ya que la reacción se realiza a una temperatura constante, tiene una menor duración comparada con la PCR y la detección del producto amplificado se puede visualizar de forma sencilla ya sea por turbidez o fluorescencia (Parida y col. 2008).

1.3.9 Tratamiento

En la actualidad no existe un antiparasitario totalmente eficaz para el tratamiento de la criptosporidiosis; sin embargo, hay agentes que parecen reducir la infección (Tzipori y Widmer 2008, Leitch y He 2012). Cuando la terapia antiretroviral disminuye la carga viral del VIH, los síntomas pueden resolverse en pacientes infectados por este parásito. Algunos nucleósidos antivirales tienen un efecto directo sobre el crecimiento del parásito *in vitro*. Debido a que el curso clínico de la criptosporidiosis depende del estado inmune del hospedador, las opciones del tratamiento varían. Las personas asintomáticas o inmunocompetentes no necesitan terapia específica. El cuidado adecuado con líquidos orales o intravenosos y el reemplazo de electrolitos ayuda a corregir la deshidratación que acompaña la diarrea aguda mientras el paciente se recupera espontáneamente. En niños, la espiramicina puede acortar la duración de la excreción de ooquistes y la diarrea, aunque los datos existentes son controvertidos (Ramírez y col. 2004).

En pacientes con sida, el tratamiento más adecuado es la reconstitución de la respuesta inmune y reducción de la carga viral mediante la terapia antiretroviral altamente efectiva (Highly Active Antiretroviral Therapy- *HAART*), la cual también ayuda a controlar el parásito (Clark 1999, Chen y col. 2002, Tzipori y Ward 2002, Ramirez y col. 2004). Si la terapia HAART no es posible o efectiva, se recomienda la combinación de terapias con un agente antimicrobiano y un agente antidiarreico como tratamiento estándar para la criptosporidiosis. Los fármacos antiparasitarios más utilizados ya sea solos o en diferentes combinaciones son la paromomicina, azitromicina y nitazoxanida, los cuales han mostrado resultados moderadamente efectivos, ya que aunque se observa una reducción en la frecuencia y volumen de las deposiciones y en la excreción de ooquistes, no se obtiene la recuperación clínica y erradicación total del parásito (Tzipori y Widmer 2008).

La nitazoxanida (AliniaTM) es el único fármaco aprobado por la agencia de control de alimentos y medicamentos (Food and Drug Administration-*FDA*) de Estados Unidos, para el tratamiento de la criptosporidiosis en adultos inmunocompetentes y niños menores de 1 año (Anderson y Curran 2007). Sin embargo, no ha mostrado efectividad en todos los casos de criptosporidiosis, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. La paromomicina se usa comúnmente en el tratamiento de animales y personas inmunocompetentes infectados con *Cryptosporidium*, sin embargo, es un fármaco costoso que produce efectos secundarios graves y que por lo tanto no puede utilizarse en pacientes inmunocomprometidos (Abubakar y col. 2007).

Otros compuestos con actividad anti-inflamatoria también se han evaluado en el tratamiento de la criptosporidiosis. Del Aguila y col. (Rueda y col. 2008) estudiaron la actividad anti-*Cryptosporidium* del compuesto Bobel-24 (2,4,6-triiodofenol) tanto *in vitro* como en un modelo animal. Estos autores encontraron una reducción del 99,6% en el crecimiento *in vitro* del parásito y observaron diferencias significativas en la eliminación de ooquistes entre los ratones tratados con el fármaco y los no tratados. Sin embargo, se requieren

estudios que confirmen la utilidad de este compuesto en el tratamiento de la criptosporidiosis en humanos.

Aunque más de 150 agentes antimicrobianos se han estudiado y pocos logran una reducción en la magnitud de los síntomas, ninguno ha eliminado la enfermedad completamente. Con la reciente secuenciación de los genomas de *C. parvum* y *C. hominis*, se han identificado nuevos blancos moleculares que podrían evaluarse para el desarrollo de fármacos efectivos en el tratamiento de la criptosporidiosis (Tzipori y Widmer 2008).

1.4 *Cyclospora* spp.

El género *Cyclospora* fue creado por Schneider en 1881 (Helmy 2010), quien identificó *Cyclospora glomerica* en el miriápodo conocido como milpiés. El primer caso de infección en humanos asociado a este protozoo se registró probablemente en 1979, cuando el parasitólogo británico Ashford (Shields y Olson 2003, Ortega y Sanchez 2010) observó microorganismos similares a coccidios en la materia fecal de personas con diarrea (2 niños y una mujer) en Papúa Guinea, sin embargo, sugirió que era una nueva especie del género *Isospora*.

En la década de los 80, el parásito fue redescubierto periódicamente por diferentes autores. En 1986, Soave y colaboradores (Shields y Olson 2003) describieron 4 casos de infección en viajeros procedentes de Haití y México y concluyeron que el agente etiológico era un patógeno entérico nuevo, al que se refirieron como "cuerpo reminiscente no esporulado de un coccidio". A partir de esta fecha, se registraron casos endémicos asociados a diarrea del viajero en Haití, Nepal y Perú, con varias denominaciones para el organismo causante de la sintomatología (Shlim 2002, Shields y Olson 2003, Ortega y Sanchez 2010). Sterling y colaboradores entre 1985 y 1987 (Ortega y Sanchez 2010), observaron "estructuras similares a *Cryptosporidium muris*" en la materia fecal de 3 personas en Perú.

En los inicios de la década de los 90s, Long y colaboradores (Ortega y Sanchez 2010) identificaron múltiples casos de infección en viajeros y personas con sida, sugiriendo que el microorganismo tenía características del ooquiste de un coccidio (debido a la presencia de esporozoitos) y de algas azul-verdosas y cianobacterias (por microscopía electrónica se observaron estructuras que eran similares a orgánulos fotosintéticos). En 1991, estos autores denominaron al microorganismo como "cuerpos similares a cianobacterias" o "cuerpos similares a coccidios" (CLB), siendo esta la denominación usada para este parásito durante varios años (Hoge y col. 1993, Sterling y Ortega 1999, Herwaldt 2000). En 1991 y 1992, Ortega y colaboradores (Ortega y col. 1993) caracterizaron este microorganismo como una nueva especie de coccidio capaz de infectar a humanos y lo incluyeron dentro del género *Cyclospora*. En 1993 estos mismos autores describieron la esporulación *in vitro* de los ooquistes del parásito y las características morfológicas del ooquiste esporulado; y en 1994 propusieron el nombre de *Cyclospora cayetanensis*, por la universidad peruana Cayetano Heredia, lugar en donde se realizaron los principales estudios (Ortega y col. 1994). En 1996, análisis filogenéticos basados en la subunidad pequeña del gen del ARN ribosomal, mostraron que *C. cayetanensis* estaba estrechamente relacionada con algunas especies de un género diferente de coccidio denominado *Eimeria* (Relman y col. 1996); y en 1999 Eberhard y col. (Eberhard y col. 1999) identificaron otras 3 especies de *Cyclospora* en primates (*C. cercopithecii*, *C. papionis*, y *C. colobi*).

1.4.1 Taxonomía, filogenia y diversidad genética

Se conoce muy poco sobre la organización genómica o secuencias de genes de *C. cayetanensis* (Shields y Olson 2003). Hasta la fecha las únicas secuencias disponibles incluyen una secuencia parcial del ADN de la *SSU rRNA*, la secuencia del 5.8 S y secuencias de las regiones espaciadoras ITS1 e ITS2 de *C. cayetanensis* y las 3 especies encontradas en primates (Eberhard y col. 1999, Adam y col. 2000, Olivier y col. 2001). Estos análisis confirmaron un alto grado de homología entre estas especies de *Cyclospora*, además de su relación cercana con el género *Eimeria*. Con la inclusión de una secuencia de *SSU rRNA*

de *Eimeria falciforme* (un coccidio de ratones) en este árbol filogenético, se identificaron 3 grupos diferentes: *Eimeria* de mamíferos, *Eimeria* de aves y *Cyclospora* (Eberhard y col. 1999). *C. cayetanensis* y las especies de primates se ubican en una rama intermedia entre las especies de *Eimeria* de mamíferos y de aves. La adición de datos moleculares de más especies de *Cyclospora*, e incluso de secuencias de otros géneros cercanos como *Cystoisospora*, podrían ayudar a resolver su ubicación taxonómica (Chacin-Bonilla 2010).

Teniendo en cuenta que las secuencias del gen de la *SSU rRNA* están altamente conservadas, varios autores han utilizado la región ITS 1 como marcador en el análisis de la variabilidad genética de *Cyclospora* (Adam y col. 2000, Olivier y col. 2001). Aunque, el análisis de dicha región permite la diferenciación de *C. cayetanensis* y *C. papionis* (Olivier y col. 2001), también se ha encontrado variabilidad entre los ooquistes de *C. cayetanensis* de una misma muestra, por lo que este marcador parece no ser útil en la determinación del origen geográfico de los aislados del parásito (Adam y col. 2000). Estos autores concluyeron que la razón más plausible para este hallazgo era la presencia de múltiples copias de secuencias diferentes del gen de la *SSU rRNA*, aunque nuevos estudios con más aislados procedentes de diferentes regiones geográficas y muestras (clínicas, ambientales, frutas) podrían ayudar a confirmar esta hipótesis (Adam y col. 2000).

Actualmente la clasificación de *Cyclospora* spp. es la siguiente: supergrupo SAR, Alveolata, Apicomplexa, Conoidasida, Coccidia y Eimeriorina (Adl y col. 2012). Hasta el momento se conocen 17 especies, 13 se han descrito en víboras, topos, miriápodos y roedores (*C. viperae*, *C. glomericola*, *C. babaulti*, *C. tropidonoti*, *C. anglomurinensis*, *C. caryolytica*, *C. talpae*, *C. ashtabulensis*, *C. megacephali*, *C. parascalopi*, *C. niniae*, *C. scinci*, and *C. zamenis*), 3 se han encontrado en monos y mandriles (*C. cercopithecii*, *C. colobi* y *C. papiones*) y una especie se ha asociado con infecciones en humanos (*C. cayetanensis*) (Ortega y Sanchez 2010). Aún se desconoce si todos los aislados de *Cyclospora*

encontrados en humanos pertenecen a la misma especie y si las especies de primates pueden infectar al hombre (Chacin-Bonilla 2010).

1.4.2 Morfología

El ooquiste esporulado de *Cyclospora* mide 8.6 μm de diámetro (7,7-9,9 μm) y en su interior se encuentran esporoquistes ovoides de 4,0 x 6,3 μm (3,3-4,4 x 5,5-7,1 μm). Cada ooquiste tiene 2 esporoquistes y cada esporoquiste contiene 2 esporozoitos. Al microscopio electrónico, el ooquiste esporulado posee una doble pared con 63 y 50 nm de grosor rodeando los 2 esporoquistes; cada uno tiene una pared de 62 nm de grosor que rodea la membrana plasmática, un cuerpo residual con glóbulos esféricos y cuerpos de Stieda y subestiercos (Ortega y col. 1994). Estos últimos son orgánulos que ocuyen una abertura en la región polar del esporoquiste de algunos coccidios, a través de la cual se liberan los esporozoitos.

1.4.3 Ciclo de vida

El hombre es el único hospedador conocido de *C. cayetanensis*. Este parásito tiene un ciclo de vida intracelular obligado dentro del epitelio del tracto gastrointestinal, en el cual se da tanto la reproducción asexual (merogonia o esquizogonia) como sexual (gametogonia) (Figura 6). La infección se inicia cuando la persona ingiere ooquistes esporulados del parásito a partir de agua o alimentos contaminados. En presencia de la bilis, tripsina y otros factores del tracto gastrointestinal, los ooquistes liberan los esporozoitos, los cuales invaden las células epiteliales del intestino delgado. Estos esporozoitos empiezan un ciclo de merogonia, en la que se generan muchos merozoitos, cada uno de los cuales es capaz de infectar una nueva célula hospedadora e iniciar otra generación de merogonia. Dos tipos de merontes (tipo I y II) con 8-12 y 4 merozoitos respectivamente se pueden generar en el interior del enterocito. Finalmente cada merozoito hijo entra en una célula epitelial y se diferencia en microgametocito masculino ó macrogametocito femenino. Estas células sexuales se unen y forman un cigoto, que madura en un ooquiste de pared gruesa. Esta estructura rompe la célula hospedadora y se excreta en la materia

fecal. Los ooquistes no son infectantes cuando son eliminados, estos requieren por lo menos una semana para esporular en el ambiente bajo condiciones favorables. Por lo tanto, no es posible la transmisión directa persona a persona. Esta es una diferencia con respecto al ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp., en el cual los ooquistes salen del hospedador esporulados. Durante la esporulación, su contenido (esporonte) se divide en dos esporoquistes, cada uno con dos esporozoitos en forma de banana. La presencia de dos esporozoitos en cada esporoquiste es el criterio fundamental del género *Cyclospora* (Sterling y Ortega 1999, Shlim 2002, Mansfield y Gajadhar 2004, Ortega y Sanchez 2010).

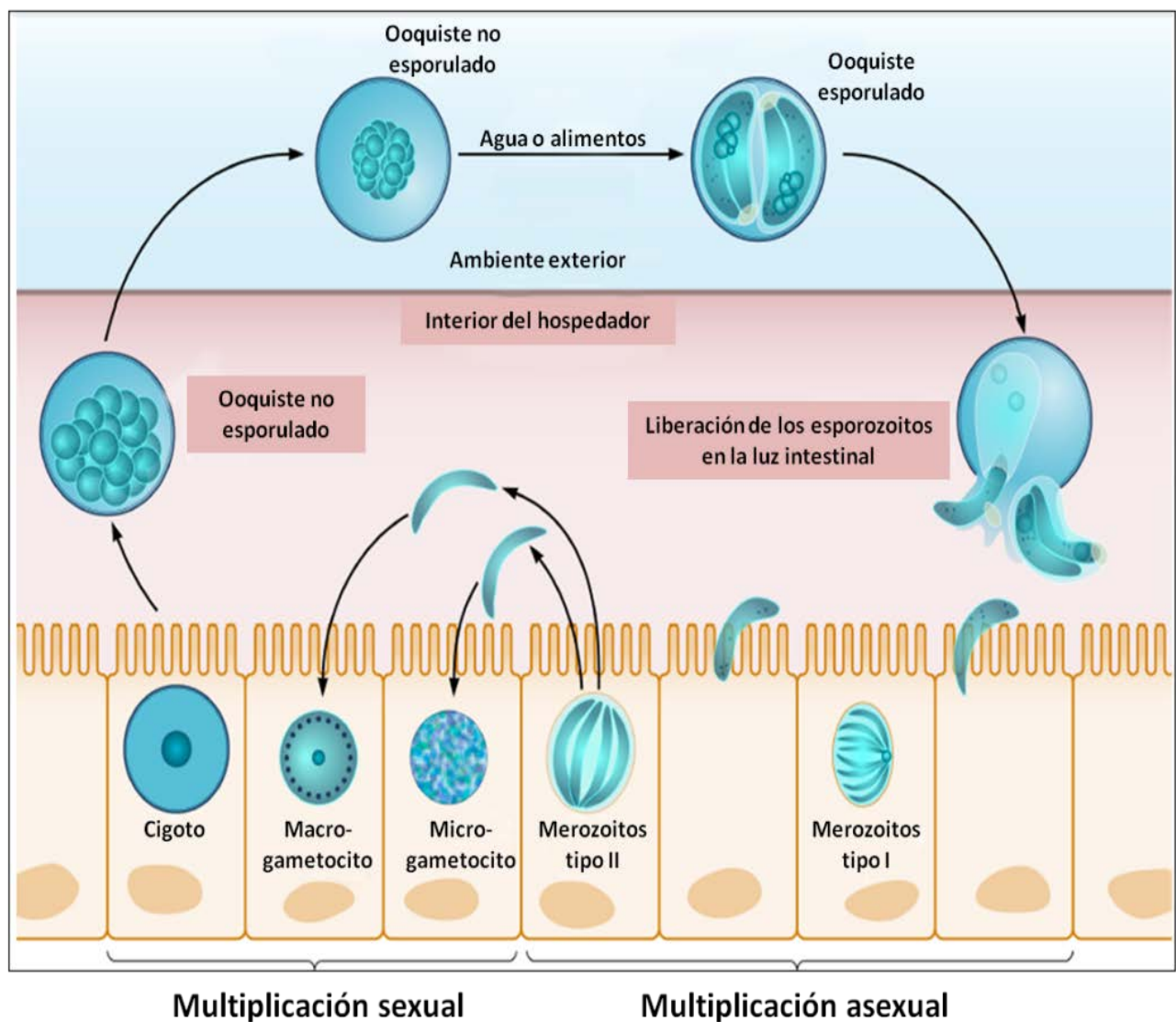


Figura 6. Ciclo de vida de *Cyclospora* spp. Tomado y traducido de (Ortega y Sanchez 2010)

1.4.4 Manifestaciones clínicas

La sintomatología de la ciclosporiasis incluye ciclos de diarrea acompañada de anorexia, fatiga, náuseas y dolor abdominal, con periodos de aparente remisión (Sterling y Ortega 1999, Shields y Olson 2003, Mansfield y Gajadhar 2004, Ortega y Sanchez 2010). En algunos casos se puede presentar fiebre baja y se han descrito complicaciones y/o secuelas asociadas a la infección como el síndrome de Guillain-Barre (Richardson y col. 1998), artritis reactiva (anteriormente síndrome de Reiter) (Connor y col. 2001) y colecistitis acalculosa (Zar y col. 2001). Los casos descritos en inmunocompetentes se presentan frecuentemente en personas con antecedente de viajes a países endémicos o asociados con el consumo de ciertos alimentos importados desde dichas regiones (Ortega y Sanchez 2010). La diarrea es autolimitada y puede durar entre dos a seis semanas. La infección también se ha documentado en pacientes con sida, entre los que se encuentran tanto viajeros como residentes en áreas endémicas en quienes la infección tiene un curso más prolongado (Ortega y Sanchez 2010).

1.4.5 Epidemiología

1.4.5.1 Distribución geográfica y prevalencia en humanos

Cyclospora cayetanensis se describió hace menos de 15 años y ha ganado importancia recientemente debido a su asociación con varios brotes por consumo de alimentos en Estados Unidos y Canadá (Shields y Olson 2003). El parásito se ha documentado en diferentes áreas geográficas, sin embargo, se considera endémico en países tropicales, que incluyen entre otros Haití, Perú y Nepal (Sterling y Ortega 1999, Shields y Olson 2003, Mansfield y Gajadhar 2004, Ortega y Sanchez 2010). Este coccidio se ha aislado de pacientes con diarrea en América, el Caribe, Europa, África, el subcontinente indio y ciertas regiones de Asia (Sterling y Ortega 1999). En Estados Unidos y Canadá, la enfermedad se ha asociado principalmente con epidemias por consumo de alimentos, mientras que en Europa y Australia, la mayoría de los casos se han relacionado con viajes a zonas endémicas (Shields y Olson 2003) y solo se han

descrito dos brotes de ciclosporiasis por consumo de alimentos en Alemania y Suecia (Doller y col. 2002, Insulander y col. 2010).

En España, los datos sobre la presencia de este parásito son todavía escasos; se ha descrito en un 2 al 4% de los casos de diarrea en viajeros (Gascon y col. 2001, Navajas y col. 2004), aunque existe el caso de un paciente, residente en España, que no refiere antecedentes de viajes (Ibáñez y col. 1999). Estos datos parecen indicar que *C. cayetanensis* es un parásito inusual aunque presente en nuestro país.

Diferentes estudios han confirmado la estacionalidad de *C. cayetanensis*, sin embargo los resultados varían de acuerdo a la región estudiada (Sturbaum y col. 1998, Sherchand y col. 1999, Lopez y col. 2003, Miegerville y col. 2003, Tram y col. 2008). La tendencia estacional en varios países coincide con las épocas cálidas y lluviosas, incluyendo Guatemala, Honduras, Jordania, Nepal e Indonesia, entre otros (Zerpa y col. 1995, Bern y col. 1999, Fryauff y col. 1999, Sherchand y col. 1999, Chacin-Bonilla 2010). En Estados Unidos y Canadá, la mayoría de los brotes de ciclosporiasis se presentaron durante la primavera y los inicios del verano (Herwaldt 2000, Shields y Olson 2003), época que coincide con el periodo de lluvias. Sin embargo, aunque aparentemente las precipitaciones están relacionadas con el aumento en los casos de ciclosporiasis, en otros países como Perú y Haití, los picos de incidencia se presentan en los meses más fríos y secos del año (Chacin-Bonilla 2010, Ortega y Sanchez 2010), e incluso en Turquía, la prevalencia del parásito aumenta durante los meses más cálidos y secos del año (Turgay y col. 2007). Lo anterior indica que en estos países, la temperatura es el principal factor asociado con la presencia del parásito.

1.4.5.2 Fuentes de infección y modos de transmisión

1.4.5.2.1 Transmisión a través de alimentos

En los países en desarrollo, la ciclosporiasis se asocia con el consumo de frutas, vegetales y otros alimentos frescos, habiéndose descrito varios brotes

epidémicos de ciclosporiasis asociados al consumo de estos alimentos en México, Guatemala, Colombia, Perú e Indonesia (Chacin-Bonilla 2010).

En los países desarrollados los brotes epidémicos se relacionan con frutas frescas importadas de países tropicales y que se ingieren sin ningún tratamiento previo que inactive o elimine el parásito. La mayoría de estos brotes se han presentado en Estados Unidos y Canadá (Chacin-Bonilla 2010, Ortega y Sanchez 2010) y el principal factor asociado fue la ingestión de fresas procedentes de Guatemala. Otras fuentes de infección incluyen albahaca, lechuga, otro tipo de vegetales verdes y guisantes, entre otros (Chacin-Bonilla 2010).

1.4.5.2.2 Transmisión hídrica

En relación a la transmisión hídrica como vía de infección para *C. cayetanensis*, varios estudios realizados en países de Sudamérica y África han identificado al agua como fuente de infección para este parásito (Rabold y col. 1994, Sturbaum y col. 1998, Sherchand y col. 1999, Dowd y col. 2003). La primera referencia que sugiere la transmisión de *Cyclospora* a través del agua aparece en 1990 y describe una epidemia que afectó al equipo médico y administrativo de un Hospital de Chicago. El agua de grifo del dormitorio de los médicos se implicó como la fuente más probable debido a que pudo haberse contaminado con agua estancada después de un fallo en el sistema de bombeo. Sin embargo solo se identificaron ooquistes del parásito en muestras fecales de los pacientes y no en el agua (Huang y col. 1995).

En Nepal en 1994, se identificó el agua municipal tratada con cloro y mezclada con agua de río como la posible fuente de *Cyclospora* entre expatriados británicos que presentaron cuadros diarreicos. Durante la epidemia, se detectaron ooquistes del parásito en las muestras de agua clorada, sin embargo, aunque no se pudo confirmar esta vía de transmisión, la posibilidad de contaminación del agua del río era elevada debido a la endemicidad descrita en esta región (Rabold y col. 1994). Otros autores, en el mismo país, mediante

un estudio de casos y controles entre viajeros y expatriados de 2 clínicas de Kathmandu, determinaron que el consumo de agua no tratada era un factor de riesgo para la ciclosporiasis. Aunque solamente en 26 (28%) de 93 casos se pudo relacionar dicha exposición con la enfermedad, ya que se encontraron estructuras morfológicamente consistentes con ooquistes de *Cyclospora* en el agua de grifo de la casa de un paciente (Hoge y col. 1993). Los ooquistes del parásito también se han descrito en aguas de consumo en Guatemala, Haití, Ghana, Vietnam y Egipto, entre otros (Bern y col. 1999, Lopez y col. 2003, Miegerville y col. 2003, Elshazly y col. 2007, Kwakye-Nuako y col. 2007, Tram y col. 2008). Un hallazgo interesante es la identificación de *C. cayetanensis* en bivalvos en Egipto (Negm 2003), lo que sugiere que el uso del mar para fines recreativos puede ser un factor de riesgo potencial para la ciclosporiasis.

De 325 brotes de infecciones por protozoos transmitidas a través del agua y descritos hasta el año 2004, se describió a *C. cayetanensis* como el agente causal en 6 (1,8%) (Karanis y col. 2007), 4 de los cuales se presentaron en países en desarrollo y endémicos para el parásito. Del año 2004 hasta la fecha solo se han descrito 3 brotes de ciclosporiasis asociados a esta fuente de infección (Baldursson y Karanis 2011).

Todos estos datos sugieren que *C. cayetanensis* puede propagarse a través del agua, ya sea potable o de tipo recreacional o indirectamente mediante la irrigación de cultivos con aguas residuales. Adicionalmente, el agua puede facilitar la contaminación de los alimentos, aumentando la transmisión de *C. cayetanensis* a través de esta fuente de infección (Mansfield y Gajadhar 2004).

1.4.5.2.3 Potencial zoonótico

El papel que los animales puedan desempeñar como reservorios naturales de *C. cayetanensis* aún se desconoce. Existen evidencias indirectas basadas en estudios epidemiológicos en países endémicos, que sugieren una posible transmisión del parásito a través de animales. El contacto con animales se ha considerado como un factor de riesgo para adquirir la infección por este

coccidio en Guatemala (Bern y col. 1999), Perú (Bern y col. 2002), Nepal (Sherchand y col. 1999) y Egipto (el-Karamany y col. 2005). Se han encontrado ooquistes compatibles con *Cyclospora* en la materia fecal de una variedad de animales, incluyendo aves (gallinas, patos), perros y primates (Garcia-Lopez y col. 1996, Li y col. 2007, Cordon y col. 2009). Mediante PCR también se ha confirmado la presencia de *C. cayetanensis* en perros, gallinas y monos (Chu y col. 2004). Sin embargo, aún no se ha podido establecer una infección exitosa por este protozoo en diferentes modelos animales (gallinas, patos, ratones, gerbos, conejos, perros, cerdos, y mandriles, entre otros), lo que sugiere la especificidad de hospedador de *C. cayetanensis* (Ortega y Sanchez 2010). De acuerdo a lo anterior el papel de los animales en la transmisión de la ciclosporiasis humana aún es controvertido, y son necesarios más estudios que permitan establecer su verdadero impacto en la epidemiología de este coccidio (Chacin-Bonilla 2010).

1.4.6 Diagnóstico

La búsqueda del microorganismo debe realizarse en turistas o extranjeros residentes en países en desarrollo, niños, pacientes VIH positivos y, en general, en todo paciente con un cuadro clínico compatible con el producido por este parásito.

1.4.6.1 Microscopía óptica

Se recomienda realizar un análisis coprológico directo y por concentración para observar los ooquistes del parásito con objetivo de 40X. Los ooquistes sin esporular se eliminan en la materia fecal de pacientes con diarrea y se observan como estructuras ovoides o esféricas de 8 a 10 μm de diámetro, con una pared refractiva bien definida y citoplasma granular (tiene 6 a 9 gránulos refringentes) (Shlim 2002). Si la muestra se almacena a temperatura ambiente (23 a 30°C) entre 7 a 15 días, los ooquistes esporulan, observándose los dos esporoquistes con los esporozoitos en su interior (Ortega y Sanchez 2010).

La tinción de Kinyoun es el método de tinción más comúnmente empleado en la identificación de los ooquistes del parásito. Los ooquistes se tiñen variablemente desde rojo intenso (ácido-resistentes), rosados o no toman la coloración y se ven como círculos refractivos muy semejantes a *Cryptosporidium* spp., pero de mayor tamaño, por lo que es necesario medir los ooquistes para no hacer un mal diagnóstico: de 4 a 5 μm para *Cryptosporidium* spp. y de 8 a 10 μm para *Cyclospora*. La tinción con safranina y modificaciones de la misma también se han utilizado para la detección de los ooquistes de *Cyclospora*, los cuales se tiñen de naranja y de forma bastante homogénea (Visvesvara y col. 1997, Galvan-Diaz y col. 2008).

Las probabilidades de encontrar ooquistes de *Cyclospora* spp. en la materia fecal aumentan al utilizar métodos de concentración. Se recomiendan las concentraciones de Sheather o de formol éter como herramientas diagnósticas complementarias para la detección del parásito (Shlim 2002, Ortega y Sanchez 2010).

1.4.6.2 Microscopía de fluorescencia

Al igual que en otros coccidios, los ooquistes de *Cyclospora* tienen una autofluorescencia blanca-azul con un filtro de excitación de 330-380 nm o verde con un filtro entre 450-490 nm (Ortega y Sanchez 2010). Esta característica se ha utilizado tanto para confirmar el diagnóstico de *Cyclospora* como para purificar los parásitos de muestras de materia fecal por citometría de flujo. Esta herramienta también se recomienda como alternativa para la detección rápida del parásito en un gran número de muestras, generalmente durante brotes epidémicos (Ortega y Sanchez 2010).

1.4.6.3 PCR

La PCR ha demostrado una mayor sensibilidad comparada con los métodos microscópicos. Relman y col. (Relman y col. 1996) desarrollaron una PCR anidada que amplifica un segmento del gen de la *SSU rRNA* y que se ha utilizado ampliamente para detectar la presencia del parásito en muestras

clínicas. Esta PCR no diferencia *Cyclospora* de *Eimeria*, por lo que se requiere la digestión del producto utilizando enzimas de restricción (PCR-RFLP) y la visualización de los patrones de restricción en gel de agarosa o la secuenciación del producto amplificado (Ortega y Sanchez 2010). Lalonde y col. (Lalonde y Gajadhar 2008) utilizaron la región ITS2 como secuencia blanco para la detección de *Cyclospora*, y además de su gran sensibilidad, esta PCR tiene la ventaja de ser específica del género *Cyclospora*, permitiendo su diferenciación de *Eimeria*; sin embargo no es capaz de identificar las especies dentro del género. Orlandi y col. (Orlandi y col. 2003) diseñaron cebadores específicos de género y especie capaces de detectar polimorfismos de un solo nucleótido (*SNPs*), diferenciando *C. cayetanensis* de las especies de *Cyclospora* descritas en primates y *Eimeria* mediante una PCR múltiple. La PCR en tiempo real también se ha aplicado en la detección de *C. cayetanensis* (Varma y col. 2003, Verweij y col. 2003, Lalonde y Gajadhar 2011, Shields y col. 2013). Varma y col. (Varma y col. 2003) basándose en la secuencia del gen de la *SSU rRNA*, diseñaron un grupo de cebadores y una sonda de hibridación fluorescente, específicos de *C. cayetanensis*. La sensibilidad de esta técnica fue de 1 ooquiste por 5 µL de reacción y no se observó reacción cruzada con los microorganismos utilizados en el control de especificidad, incluyendo diferentes especies de *Eimeria*, *C. colobi*, varias especies de microsporidios; *C. parvum* y *C. muris*, entre otros. Además de la *SSU rRNA*, el gen *hsp70* también se ha utilizado como secuencia blanco en protocolos de PCR en tiempo real para la detección de *C. cayetanensis* (Shields y col. 2013). Lalonde y col. (Lalonde y Gajadhar 2011) diseñaron una PCR en tiempo real para la detección de varios géneros de coccidios, y basados en las temperaturas de disociación pudieron identificar en una misma reacción *C. cayetanensis*, *C. parvum*, *C. muris*, *T. gondii*, *Eimeria bovis*, *Eimeria acervulina*, *Isospora suis* y *Sarcocystis cruzi*.

1.4.7 Tratamiento

El fármaco de elección para la ciclosporiasis es el trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) tanto para niños como para adultos. El tratamiento se da habitualmente por vía oral, pero puede ser administrado por vía intravenosa en

el caso de intolerancia por vía oral debido a las náuseas, vomito y otros síntomas gastrointestinales que puede desencadenar el fármaco. La ciprofloxacina se utiliza como terapia alternativa, especialmente en pacientes que son alérgicos a los fármacos que contienen sulfamidas, sin embargo, existen evidencias de fallos en el tratamiento con este antibiótico. La nitazoxanida también se ha evaluado en el tratamiento de protozoos y helmintos incluyendo *Cyclospora*, para la cual ha demostrado tener una eficacia entre el 71-87%, a partir de tres ensayos clínicos (Ortega y Sanchez 2010).

1.5 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La calidad del agua destinada al uso y consumo humano se evalúa de manera regular con el fin de prevenir brotes infecciosos de origen hídrico que puedan ser causados por bacterias, virus, protozoos y otros parásitos. La identificación de los riesgos, fuentes de infección, rango de hospedadores y diversidad de especies patógenas para el hombre, son importantes a la hora de establecer medidas adecuadas de prevención y control de estas infecciones.

La microsporidiosis y las enfermedades producidas por *Cryptosporidium* spp. y *Cyclospora cayetanensis* están consideradas como enfermedades emergentes (Didier y Weiss 2008, Ortega y Sanchez 2010, Chalmers y col. 2011), producidas por parásitos que tienen en común, además de otras características, el ser microorganismos oportunistas, que cobran mayor importancia al causar enfermedad persistente en personas inmunocomprometidas como aquellas que tienen VIH/sida. Sin embargo, aunque estos parásitos tradicionalmente no se han considerado importantes agentes de infección en personas inmunocompetentes, recientemente se ha observado un incremento en el número de casos publicados en este tipo de pacientes, los cuales corresponden principalmente a infecciones en personas que viajan a países en desarrollo y residentes en países tropicales, especialmente en población infantil (Didier y Weiss 2008, Ortega y Sanchez 2010, Chalmers y col. 2011). Además, algunos de estos parásitos, también se han asociado con epidemias de enfermedades gastrointestinales relacionadas con el consumo de agua debido a la gran resistencia que presentan a los tratamientos comúnmente utilizados en la actualidad (Sharma y col. 2003, Gajadhar y Allen 2004).

En España, los datos relativos a la presencia de los microsporidios y coccidios intestinales en aguas destinadas al uso humano, ya sean de consumo o recreacionales, son escasos, especialmente si tenemos en cuenta que las directivas relacionadas con la calidad sanitaria del agua no contemplan la búsqueda de estos microorganismos. Adicionalmente, son pocos los datos

Introducción: Planteamiento y justificación del trabajo

publicados con respecto a la variabilidad molecular de estos parásitos tanto en muestras de humanos como de animales y muestras ambientales.

Teniendo en cuenta lo anterior, y con el objetivo de contribuir al conocimiento de la epidemiología y los factores de riesgo asociados con los microsporidios, *Cryptosporidium* spp. y *Cyclospora* spp. en España, se realizó un estudio sobre la presencia de estos parásitos en aguas potables, residuales y recreacionales; así como también la caracterización molecular de las especies patógenas para humanos en muestras clínicas, de animales y en aguas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de la epidemiología molecular de los microsporidios y coccidios intestinales en muestras ambientales de la zona centro de España y en muestras clínicas de humanos y animales de diferentes regiones del país.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar la presencia de microsporidios y *C. cayetanensis* en aguas potables, residuales y superficiales de la zona centro de España, durante el periodo 2008-2009.
- ✓ Realizar la caracterización molecular de especies patógenas de microsporidios detectadas en muestras de agua de la zona centro de España, así como también de muestras procedentes de humanos y animales de diferentes regiones del país.
- ✓ Determinar la presencia de *Cryptosporidium* spp. en aguas potables, residuales y recreacionales de la zona centro de España, durante el periodo 2010-2011.
- ✓ Determinar los subtipos de las especies *C. hominis* y *C. parvum* en muestras de agua de la zona centro de España.
- ✓ Estudiar la variabilidad genética de varias cepas del microsporidio *E. intestinalis* mediante la aplicación de nuevos marcadores moleculares.

3. ESTUDIOS EXPERIMENTALES

3.1 Estudio 1: Molecular Characterization of Human-Pathogenic Microsporidia and *Cyclospora cayetanensis* Isolated from Various Water Sources in Spain: a Year-Long Longitudinal Study

Ana Luz Galván,^{a,b} Angela Magnet,^a Fernando Izquierdo,^a Soledad Fenoy,^a Cristina Rueda,^a Carmen Fernández Vadillo,^a Nuno Henriques-Gil,^c Carmen del Aguila^a.

Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, Madrid, Spain^a; Escuela de Microbiología, Grupo de Parasitología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia^b; Laboratorio de Genética, Facultad de Medicina, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, Madrid, Spain^c.

Publicado en: Applied of Environmental Microbiology 2013; 79(2): 449-59.

Resumen

Se evaluó la presencia de microsporidios y *Cyclospora cayetanensis* (primavera de 2008 a invierno de 2009) en varias Estaciones de Tratamiento de Agua Potable (ETAPs), Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) y áreas de influencia de 4 ríos de la zona centro de España. Las muestras de agua se obtuvieron siguiendo el protocolo 1623 de la Agencia para la Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) y se concentraron mediante el sistema IDEXX Filta-Max®. Mediante PCR, los microsporidios se detectaron en un 49% de las muestras evaluadas (109/223) mientras que *Cyclospora* spp. se encontró en un 9% (20/223). Se identificó la presencia de ambos parásitos en un 5,4% de las muestras (12/223). Las especies de microsporidios identificadas correspondieron a *Enterocytozoon bieneusi* (genotipos C, D y D-like), *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi* (genotipos I y III) y *Anncaliia (Brachiola) algerae*. *C. cayetanensis* se identificó en 17 de las 20 muestras positivas para este género. La distribución de resultados por estación reveló que los microsporidios fueron más frecuentes en primavera e invierno, mientras que *Cyclospora* spp. presentó una mayor frecuencia en primavera. Hasta donde tenemos conocimiento este es el primer estudio longitudinal de un año de duración, que demuestra la presencia de *C. cayetanensis* en aguas procedentes de plantas potabilizadoras. Además, se resalta la presencia de especies y genotipos de microsporidios patógenos para humanos, en aguas potables, residuales y superficiales de la zona centro de España. La realización de nuevos estudios que contribuyan al conocimiento sobre la distribución y supervivencia de estos parásitos en muestras ambientales en España, confirmarían su potencial de transmisión hídrica. Adicionalmente, es importante señalar que aunque las ETAPs y EDARs estudiadas cumplen con la normativa europea y nacional sobre la calidad del agua, la presencia tanto de *C. cayetanensis* como de microsporidios (los cuales no están incluidos en dichas normas) en las muestras de agua de estas plantas, sugiere la necesidad de actualizar el listado de patógenos de origen parasitario que deben ser controlados en las aguas destinadas para el consumo humano.

Molecular Characterization of Human-Pathogenic Microsporidia and *Cyclospora cayetanensis* Isolated from Various Water Sources in Spain: a Year-Long Longitudinal Study

Ana Luz Galván,^{a,b} Angela Magnet,^a Fernando Izquierdo,^a Soledad Fenoy,^a Cristina Rueda,^a Carmen Fernández Vadillo,^a Nuno Henriques-Gil,^c Carmen del Aguila^a

Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, Madrid, Spain^a; Escuela de Microbiología, Grupo de Parasitología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia^b; Laboratorio de Genética, Facultad de Medicina, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, Madrid, Spain^c

Recent studies suggest the involvement of water in the epidemiology of *Cyclospora cayetanensis* and some microsporidia. A total of 223 samples from four drinking water treatment plants (DWTPs), seven wastewater treatment plants (WWTPs), and six locations of influence (LI) on four river basins from Madrid, Spain, were analyzed from spring 2008 to winter 2009. Microsporidia were detected in 49% of samples (109/223), *Cyclospora* spp. were detected in 9% (20/223), and both parasites were found in 5.4% (12/223) of samples. Human-pathogenic microsporidia were detected, including *Enterocytozoon bieneusi* (C, D, and D-like genotypes), *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi* (genotypes I and III), and *Anncaliia algerae*. *C. cayetanensis* was identified in 17 of 20 samples. To our knowledge, this is the first study that shows a year-long longitudinal study of *C. cayetanensis* in drinking water treatment plants. Additionally, data about the presence and molecular characterization of the human-pathogenic microsporidia in drinking water, wastewater, and locations of influence during 1 year in Spain are shown. It is noteworthy that although the DWTPs and WWTPs studied meet European and national regulations on water sanitary quality, both parasites were found in water samples from these plants, supporting the idea that new and appropriate controls and regulations for drinking water, wastewater, and recreational waters should be proposed to avoid health risks from these pathogens.

Cyclospora cayetanensis and several species of microsporidia are recognized as emerging human pathogens (1, 2). They have transmission stages that can be highly resistant to external environmental conditions and to many physical and chemical disinfection methods routinely used as bactericides in drinking water plants, swimming pools, and irrigation systems. These exogenous transmission stages are microscopic in size and of low specific gravity, facilitating their easy dissemination in freshwater or seawater. Also animals, both vertebrates and invertebrates, have been reported as reservoirs for microsporidia, which contribute to the dissemination of the parasites by environmental contamination with stool and/or urine from these reservoirs (1).

C. cayetanensis and microsporidia have been found in drinking water, wastewater, and recreational water (3–5), and they have been associated with waterborne outbreaks worldwide (6, 7). Because of their waterborne transmission potential, both *Cyclospora* and microsporidia (*Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, and *Vittaforma corneae*) have been included in the last two drinking water contaminant candidate lists (contaminant candidate list 2 [CCL2] and CCL3) of the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (8, 9).

In Europe, regulation related to the quality of sanitary water for human consumption has been adapted from Directive 98/83/EEC, which specifies the need to detect fecal bacteria indicators and also establishes a water turbidity limit to determine the presence of *Cryptosporidium* and/or other microorganisms and parasites when this is considered appropriate by the authorities. However, microsporidia and *Cyclospora* are not specifically monitored. Likewise, current environmental regulation of bathing water quality (Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council, concerning the management of bathing water quality; and Real Decreto

1341/2007 of the Spanish Government, concerning the management of bathing water quality) and of the use of sewage sludge (Directive 86/278/EEC of the Council Directive on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture) and regenerated water (Real Decreto 1620/2007 of the Spanish Government, concerning the management of regenerated water) does not involve a search for these parasites.

So far, in Spain there has been only one study on the presence of microsporidia in water samples (10), and in relation to *C. cayetanensis* there are no up-to-date published data on environmental samples. Similarly, to date, data regarding the prevalence of these parasites in the Spanish population are scarce. For this reason and to contribute to the understanding of the epidemiology and risk factors associated with them, we investigated their presence in waters obtained from drinking water and wastewater treatment plants (DWTPs and WWTPs, respectively) and locations of influence (LI) of such plants during a 1-year survey.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection. A year-long longitudinal study from spring 2008 to winter 2009 was designed to evaluate and characterize the presence of microsporidia and *Cyclospora* spp. in different kinds of water. Four river basins (RB) were selected for this study. All of them had livestock activity,

Received 10 September 2012 Accepted 22 October 2012

Published ahead of print 2 November 2012

Address correspondence to Carmen del Aguila, cagupue@ceu.es.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.02737-12

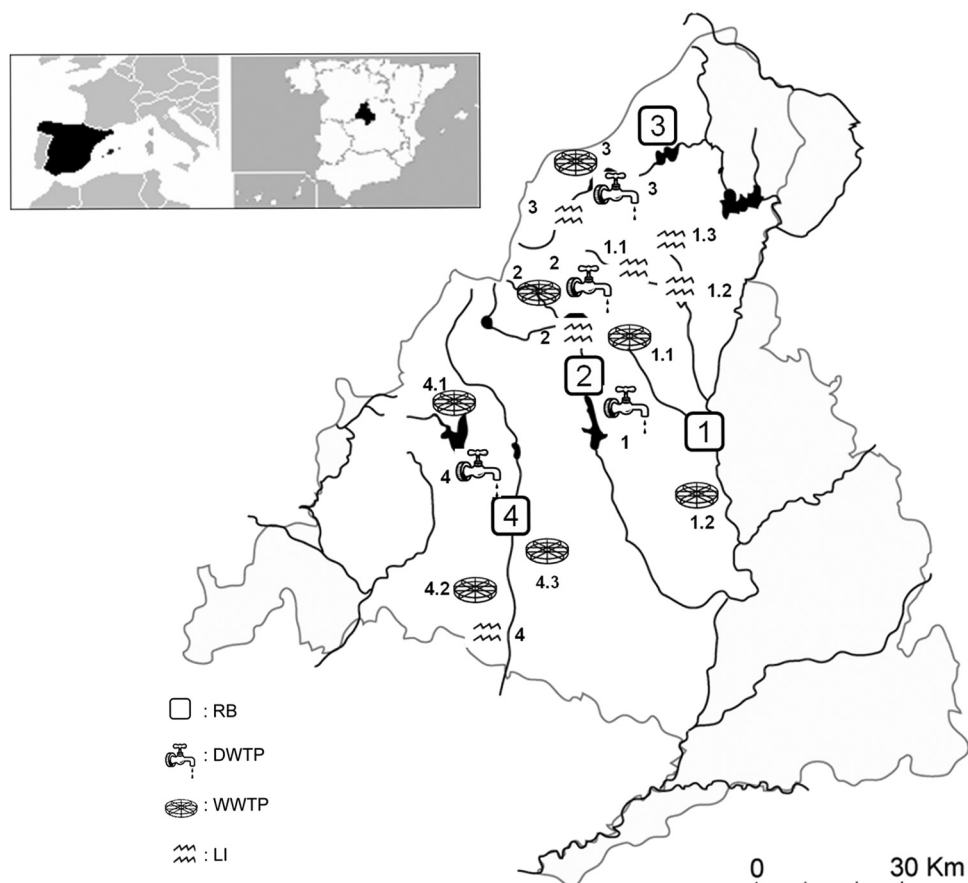


FIG 1 Geographical location of the studied sampling points, including four drinking water treatment plants (DWTPs), seven wastewater treatment plants (WWTPs), and six locations of influence (LI) located on four river basins (RB): Guadalix/Jarama (1), Manzanares (2), Lozoya (3), and Guadarrama (4). The template map was republished from reference 11 with kind permission from Springer Science+Business Media B.V.

mainly bovines for breeding or milk production. The 17 sampling points chosen are shown in Fig. 1. Water treatment in DWTPs includes preoxidation, prechlorination, coagulation, flocculation, decantation, and disinfection (ozone and chloramines). Wastewater procedures in all the WWTPs evaluated in our study were based on physicochemical and biological treatments with activated sludge.

Sampling was done as described by Magnet et al. (11). Each season of the year, sampling was done in duplicate. A total of 223 water samples were obtained. For DWTPs, up to 100 liters of water was collected from each site (at the point of entry, raw water, and at the end of the process, finished water). For WWTPs (both raw and treated water) and LI, up to 50 liters of water was collected. In all cases water samples were concentrated using an IDEXX Filta Max system as per the manufacturer's instructions (12). A total of 5 ml was finally eluted from each concentrated sample. Three-hundred microliters was used for DNA extraction, and 50 μ l was used for microscopy. Samples for molecular analysis were kept at -80°C .

Staining methods. All water samples were stained with Weber's chromotrope stain to investigate microsporidia and with Kinyoun stain to search for structures morphologically compatible with *Cyclospora* spp. Microscopic analysis was done at a magnification of $\times 1,000$. Viewing patterns for microsporidia included spores with a bright pinkish-red stain and either a clear vacuole-like polar end or a belt-like stripe in the middle of the spore. For *Cyclospora*, structures ranging from 8 to 10 μm with variable morphology—round, collapsed, or distorted on one side—and variable staining (colorless to deep purple) were evaluated.

DNA extraction and purification. DNA was obtained from 300 μ l of the 223 concentrated water samples by bead disruption of spores using a

Fast-DNA-Spin soil kit following the protocol described by da Silva et al. (13). PCR inhibitors were removed using a QIAquick PCR kit (Qiagen, Chatsworth, CA) following the manufacturer's instructions. Extracted DNA was stored at 4°C until PCR amplification.

PCR amplification. Amplification reactions were performed using a GeneAmp kit (PerkinElmer, MA) in 25 μ l of reaction mixture with 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates, 0.2 μM each primer, and buffer with $1\times$ MgCl_2 and 1.25 U of *Taq* polymerase. A Gene Amp PCR system 9700 thermocycler (PerkinElmer, MA) was used. PCR products were analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide and examined under UV light. The sizes of the amplicons were compared with a standard 100-bp DNA ladder. For every PCR, both positive and negative controls were included.

Microsporidian phylum and species amplification. PCR was performed by using different diagnostic primer pairs. Generic microsporidian primer pairs MicR1 and MicF1 were used to confirm the presence of microsporidia (4); microsporidian small-subunit rRNA coding regions (SSU-rRNA) were amplified using the amplification protocol described for each species and the following species-specific primers: EBIEF1/EBIER1 for *Enterocytozoon bienersi* (14), SINTF/SINTR for *Encephalitozoon intestinalis* (15), ECUNF/ECUNR for *Encephalitozoon cuniculi* (16), EHELF/EHELRL for *Encephalitozoon hellem* (17), NALGf2/NALGR1 for *A. algerae* (18), and NCORF1/NCORR1 for *V. corneae* (19).

Enterocytozoon bienersi genotyping. *Enterocytozoon bienersi* genotyping was performed by sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA. For this purpose, a fragment of 536 bp containing the 243 bp of the ITS was amplified using the two primers

Applied and Environmental Microbiology

TABLE 1 Prevalence of microsporidia in water samples from different treatment plants and locations of influence during a year-long longitudinal study: comparison between results obtained by a modified trichrome stain and PCR

| Sampling point (<i>n</i>) ^a | Prevalence of microsporidia by time period and detection method (no. of positive samples [%]) ^b | | | | | | | | | |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|---------------------|------------|-------------|--------------|
| | Spring | | Summer | | Autumn | | Winter ^c | | Year | |
| | MTS | PCR | MTS | PCR | MTS | PCR | MTS | PCR | MTS | PCR |
| DWTP (16) | 3 | 6 | 4 | 4 | 3 | 6 | 2 | 1 | 12 (19) | 17 (27) |
| WWTP (28) | 7 | 22 | 13 | 20 | 4 | 12 | 3 | 14 | 27 (24) | 68 (61) |
| LI (12) | 2 | 8 | 4 | 7 | 4 | 4 | 1 | 5 | 11 (23) | 24 (50) |
| Total (no. of positive samples/total no. of samples [%]) | 12/56 (21) | 36/56 (64) | 21/56 (37) | 31/56 (55) | 11/56 (20) | 22/56 (39) | 6/55 (11) | 20/55 (36) | 50/223 (22) | 109/223 (49) |

^a *n*, number of sampling points; DWTP, drinking water treatment plant; WWTP, wastewater treatment plant; LI, location of influence.

^b MTS, modified trichrome stain.

^c One sample from a DWTP in this season could not be obtained.

described by Galván et al. (20). PCR amplifications were performed using the following cycling conditions: 35 cycles of denaturing at 94°C for 30 s, alignment at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 90 s.

Encephalitozoon cuniculi genotyping. *E. cuniculi* genotyping was performed by sequence analysis of a fragment of the polar tube protein (PTP) gene. A 363-bp fragment of the PTP was amplified from *E. cuniculi* DNA by PCR using the primers 5'-GCAGTTCCAGGCTACTAC-3' and 5'-AGGAACCTCCGATGTTCC-3' and following the protocol described by Xiao et al. (21).

Cyclospora. A nested PCR described by Relman et al. (22) which amplifies the coding region of the rRNA small subunit (SSU-rRNA) was used to confirm the presence of *Cyclospora* spp. For primary PCR, primers CYCF1 and CYCR2 were used. For secondary PCR, a fragment of 308 bp was amplified from 10 µl of the primary PCR product with primers CYCF3 and CYCR4. Positive samples with this PCR were sequenced to determine *Cyclospora* species.

DNA sequence analysis. PCR products were purified with a QIAquick PCR kit (Qiagen, Chatsworth, CA) and sequenced on both ends through the sequencing service of Macrogen Laboratories (South Korea). The resulting sequences were edited and aligned with the Bioedit Sequence Alignment Editor, version 7.0.5.3 (23).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using PASW 18 (IBM SPSS) software for Windows. Differences in microsporidian and *Cyclospora* sp. prevalence rates between seasons were evaluated using nonparametric Cochran and McNemar tests, and *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Prevalence of microsporidia and *Cyclospora* spp. in water samples. A total of 223 samples were collected over a 1-year period from 17 sampling points that included four drinking water treatment plants (DWTPs), seven wastewater treatment plants (WWTPs), and six locations of influence (LI) on four river basins (RB) (Fig. 1). Microsporidia and/or *Cyclospora* spp. were detected by PCR in 52% (117 out of 223) of the water samples, with 49% (109 out of 223) positive for microsporidia, 9% (20 out of 223) positive for *Cyclospora* spp., and 5.4% (12 out of 223) positive for both parasites.

In reference to the presence of microsporidia in water samples analyzed by PCR, the highest percentages of positive samples were found in WWTPs and LI, with an annual prevalence rates of 61 and 50%, respectively (Table 1). In WWTPs it was common to find the parasite in both raw and finished water, with 64.3% (36/56) and 57.1% (32/56), respectively, of positive samples (Fig. 2 and Table 2). Microsporidian prevalence in DWTPs was lower (27%) (Table 1), and this parasite was more prevalent in raw water (35.5%; 11/31) than in finished water (18.8%; 6/32) (Fig. 2 and Table 2). Distribution of results by season revealed that although microsporidia were present throughout the year of the study, they have a higher prevalence in spring (64%) and summer (55%),

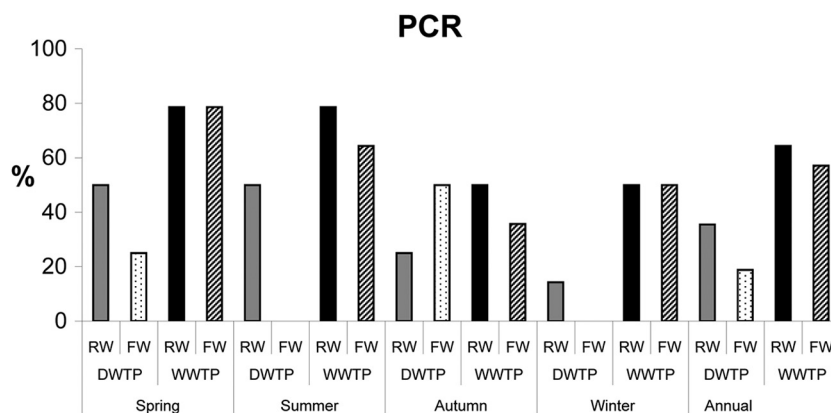
**FIG 2** Distribution of results obtained by PCR for microsporidia in raw and finished waters from DWTPs and WWTPs during a year-long longitudinal study. The percentage of positive samples is shown on the y axis. RW, raw water; FW, finished water.

TABLE 2 Microsporidian presence detected by PCR in water samples according to season and fluvial basins

| Fluvial basin (region no.) | Sampling point ^a | Microsporidian detection by sampling time and no. | | | | | | | |
|----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------|---|--------|---|--------|---|-----------------|---|
| | | Spring | | Summer | | Autumn | | Winter | |
| | | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Guadalix/Jarama (1) | DWTP 1-R | — | + | — | — | — | + | — | — |
| | DWTP 1-F | — | — | — | — | — | + | — | — |
| | WWTP 1.1-R | + | + | — | + | — | + | + | — |
| | WWTP 1.1-F | + | + | + | + | — | — | — | + |
| | WWTP 1.2-R | + | + | + | — | + | + | — | + |
| | WWTP 1.2-F | + | + | + | — | — | + | — | + |
| | LI 1.1 | + | + | — | + | — | — | — | + |
| | LI 1.2 | + | + | — | + | + | — | — | — |
| | LI 1.3 | + | + | — | + | — | — | — | + |
| Manzanares (2) | DWTP 2-R | — | — | — | + | — | — | — | + |
| | DWTP 2-F | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | WWTP 2-R | — | + | + | + | — | + | — | + |
| | WWTP 2-F | — | + | + | + | — | + | — | + |
| Lozoya (3) | LI 2 | — | + | + | — | + | — | — | + |
| | DWTP 3-R | + | + | + | + | + | — | ND ^b | — |
| | DWTP 3-F | + | + | — | — | + | — | — | — |
| | WWTP 3-R | + | + | + | + | + | — | — | + |
| | WWTP 3-F | + | — | + | + | — | + | — | + |
| Guadarrama (4) | LI 3 | — | + | — | + | — | — | — | + |
| | DWTP 4-R | + | — | — | + | — | — | — | — |
| | DWTP 4-F | — | — | — | — | + | + | — | — |
| | WWTP 4.1-R | — | + | + | + | — | — | — | + |
| | WWTP 4.1-F | — | + | — | — | — | — | — | + |
| | WWTP 4.2-R | — | + | + | — | + | — | — | + |
| | WWTP 4.2-F | + | + | + | — | + | + | — | + |
| | WWTP 4.3-R | + | + | + | + | + | — | — | + |
| | WWTP 4.3-F | + | + | + | — | — | — | — | + |
| | LI 4 | + | — | + | + | + | + | — | + |

^a DWTP, drinking water treatment plant; WWTP, wastewater treatment plant; LI, location of influence; R, raw water; F, finished water.

^b ND, not done. One sample from a DWTP in this season could not be obtained.

with WWTPs showing the highest number of positive samples (22 and 20, respectively) (Table 1).

Two of the four DWTPs (DWTP 3 and DWTP 4) were positive for microsporidia in spring, summer, and autumn (Table 2). Both raw and finished water were positive at DWTP 3 in spring and autumn, and in summer microsporidia were found only in raw water. DWTP 4 was positive for microsporidia only in raw water in spring and summer, but in autumn the parasite was detected only in finished water. The other plants (DWTP 1 and DWTP 2) had positive samples in two of the four seasons (Table 2). With regard to LI, spring and summer were the seasons with the highest number of positive samples (8 and 7, respectively), followed by winter (5) and autumn (4) (Tables 1 and 2). For all the treatment plants and LI evaluated, there was no association between the presence of microsporidia and the river basins studied (Table 2). Weber's chromotrope stain showed a lower sensitivity (22%) than PCR (49%) in the detection of this parasite (Table 1).

Cyclospora spp. had an annual prevalence of 9% by PCR (Table 3). The distribution of results by season showed that spring had the highest prevalence of positive samples with 23% (13/56), followed by autumn with 7% (4/56), summer with 4% (2/56), and winter with 2% (1/55) (Table 3). WWTPs showed the highest percentage of positive samples, with an annual prevalence of 13%

(Table 3), with the parasite being more frequent in raw water (16.1%; 9/56) than finished water (10.7%; 6/56) (Fig. 3). Only in spring was *Cyclospora* prevalence higher in WWTPs in finished water, with 35.7% (5/14), than raw water, with 21.4% (3/14) (Fig. 3). Both DWTPs and LI had positive samples only in the spring, with annual prevalences of 6% and 2%, respectively (Table 3). In DWTPs the parasite was detected in both raw water (37.5%; 3/8) and finished water (12.5%; 1/8) (Fig. 3 and Table 3). PCR showed a higher sensitivity (9%) in the detection of this coccidian than Kinyoun stain (4%) (Table 3).

C. cayetanensis was confirmed by sequence analysis of the PCR product in 17 of 20 samples that were positive (Table 4). Unfortunately, in three samples the quantity of DNA amplified was not suitable for sequencing. There was an association between the presence of the parasite and the Guadarrama River basin in spring since all samples that were positive belonged to this watershed (Table 4). All sampling points belonging to the Guadalix/Jarama basin were negative for the parasite (Table 4).

Significant differences in microsporidian and *Cyclospora* sp. prevalence rates between the seasons evaluated could not be found.

Species identification and molecular characterization of microsporidia. Microsporidian species identification was per-

Applied and Environmental Microbiology

TABLE 3 Prevalence of *Cyclospora* spp. in water samples from different treatment plants and locations of influence during a year-long longitudinal study: comparison between results obtained by Kinyoun stain and PCR

| Sampling point (<i>n</i>) ^a | Prevalence of microsporidia by time period and detection method (no. of positive samples [%]) ^b | | | | | | | | | |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------|----------|----------|----------|---------------------|----------|------------|------------|
| | Spring | | Summer | | Autumn | | Winter ^c | | Year | |
| | KS | PCR | KS | PCR | KS | PCR | KS | PCR | KS | PCR |
| DWTP (16) | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0) | 4 (6) |
| WWTP (28) | 5 | 8 | 0 | 2 | 2 | 4 | 2 | 1 | 9 (8) | 15 (13) |
| LI (12) | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (2) | 1 (2) |
| Total (no. of positive samples/total no. of samples [%]) | 6/56 (11) | 13/56 (23) | 0/56 (0) | 2/56 (4) | 2/56 (4) | 4/56 (7) | 2/55 (4) | 1/55 (2) | 10/223 (4) | 20/223 (9) |

^a DWTP, drinking water treatment plant; WWTP, wastewater treatment plant; LI, location of influence; *n*, number of sampling points.^b KS, Kinyoun stain.^c One sample from a DWTP in this season could not be obtained.

formed by amplification of the small subunit rRNA (SSU-rDNA) coding regions (Table 5). *Encephalitozoon intestinalis* was the most commonly detected species, with an annual prevalence of 26.6% in positive samples, followed by *Enterocytozoon bieneusi* (16.5%), *Encephalitozoon cuniculi* (11.9%), and *A. algerae* (1.8%) (Table 5). *Enterocytozoon bieneusi*, the more frequent microsporidia in humans, was detected in three of the four seasons and was most common in spring (27.7%), followed by winter (25%) and summer (9.7%). *Encephalitozoon intestinalis* was common in spring (58.3%) and winter (40%), and there were positive samples for *E. cuniculi* only in winter (65%). *A. algerae* was found in one sample from spring and another from autumn. Undetermined species represented 59.6% (65 out of 109) of samples. A sequence analysis of the phylum PCR product of 32 of these samples was done; however, we identified microsporidian species in only 3 samples. Sequences with similarities of 93% and 91% to *Orthosomella operophterae* (GenBank accession number AJ302316) were found in DWTP 1 and WWTP 1, respectively. In LI 1.2 we found a sequence with 88% identity to *Pleistophora* sp. (GenBank accession number D85500).

Enterocytozoon bieneusi genotyping was performed by sequence analysis of the ITS region of rDNA. A total of 18 samples were studied, but the genotype was determined in only 13 of the samples (Table 6). Genotype D-like (GenBank accession no. DQ836345) was the most frequent, being present in 8 of the 13 samples genotyped and in three of the four seasons evaluated. We

also identified genotype C (GenBank accession number AF101199) (4/13) and genotype D (GenBank accession number AF023145) (1/13) (Table 6).

In reference to *Encephalitozoon cuniculi* genotyping, 13 samples were studied by sequence analysis of a 363-bp fragment of the PTP gene. Only three samples were successfully genotyped. Genotype I (rabbit strain) (GenBank accession number AF310677) was detected in one WWTP (WWTP 4.1-F) and in a river basin location (LI 2), and genotype III (dog strain) (GenBank accession number AF310679) was identified in one WWTP (WWTP 4.2-R).

DISCUSSION

Emerging waterborne pathogens include bacteria such as *Campylobacter jejuni*, *Mycobacterium* spp., *Legionella pneumophila*, and *Pseudomonas aeruginosa*, several viruses such as calicivirus and hepatitis E virus, and parasites such as *Cryptosporidium* spp., *C. cayetanensis*, and microsporidia (33). Although these organisms have been described as human infection agents for many years, it is only recently that they have been identified as waterborne pathogens. Development of detection methods, including molecular methods and immunological and immunomagnetic separation techniques, has improved the efficient search for these parasites, highlighting their presence in environmental samples (33).

In our study, apart from PCR, we used modified trichrome and Kinyoun stains to detect microsporidia and *Cyclospora* spp., respectively, in water samples, and although both stains had lower

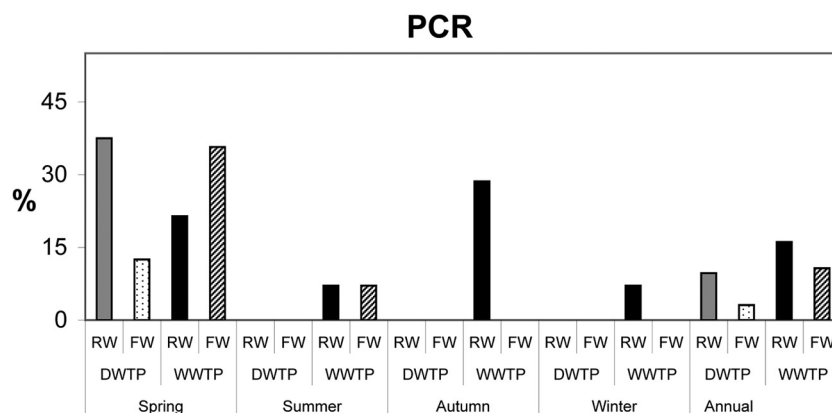
**FIG 3** Distribution of results obtained by PCR for *Cyclospora* spp. in raw and finished waters from DWTPs and WWTPs during a year-long longitudinal study. The percentage of positive samples is shown on the y axis. RW, raw water; FW, finished water.

TABLE 4 Presence of *Cyclospora* spp. detected by PCR in water samples according to season and fluvial basins

| Fluvial basin (region no.) | Sampling point ^a | <i>Cyclospora</i> detection by sampling time and no. | | | | | | | |
|----------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------|---|--------|---|--------|---|-----------------|---|
| | | Spring | | Summer | | Autumn | | Winter | |
| | | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Guadalix/Jarama (1) | DWTP 1-R | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | DWTP 1-F | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | WWTP 1.1-R | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | WWTP 1.1-F | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | WWTP 1.2-R | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | WWTP 1.2-F | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | LI 1.1 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | LI 1.2 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | LI 1.3 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Manzanares (2) | DWTP 2-R | — | + | — | — | — | — | — | — |
| | DWTP 2-F | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | WWTP 2-R | — | — | — | — | + | — | — | — |
| | WWTP 2-F | + | — | — | — | — | — | — | — |
| | LI 2 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Lozoya (3) | DWTP 3-R | — | — | — | — | — | — | ND ^b | — |
| | DWTP 3-F | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | WWTP 3-R | — | — | — | + | + | — | — | — |
| | WWTP 3-F | — | — | — | + | — | — | — | — |
| | LI 3 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Guadarrama (4) | DWTP 4-R | + | + | — | — | — | — | — | — |
| | DWTP 4-F | — | + | — | — | — | — | — | — |
| | WWTP 4.1-R | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | WWTP 4.1-F | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | WWTP 4.2-R | + | — | — | — | + | + | — | + |
| | WWTP 4.2-F | + | + | — | — | — | — | — | — |
| | WWTP 4.3-R | + | + | — | — | — | — | — | — |
| | WWTP 4.3-F | + | + | — | — | — | — | — | — |
| | LI 4 | + | — | — | — | — | — | — | — |

^a DWTP, drinking water treatment plant; WWTP, wastewater treatment plant; LI, location of influence; R, raw water; F, finished water.

^b ND, not done. One sample from a DWTP in this season could not be obtained.

^c Species not identified.

sensitivity than PCR, it is important to emphasize their usefulness as an additional diagnostic tool for confirmation of these organisms. With the modified trichrome stain, we detected microsporidian spores in several PCR-negative samples (data not shown). These results could be explained either by PCR inhibitors in environmental samples, which can be concentrated by the previous processes of filtration of water samples, or by the presence of spores belonging to microsporidia that were not detected with the

phylum PCR used in our study, which could be possible given the fact that there are more than 150 genera described (1).

Microsporidian prevalence ranges between 5 to 50% in patients with AIDS and concomitant chronic diarrhea (1); these percentages vary depending on the geographic area studied and the diagnostic method used. In Spain, microsporidia have been described in patients with HIV/AIDS (34–36), in HIV-negative patients, including travelers (37), elderly people (38), and organ

TABLE 5 Seasonal distribution of microsporidian species in water samples from the central area of Spain by PCR

| Microsporidian species | Prevalence by time period (no. of positive samples [%]) ^a | | | | |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | Spring (n = 36) | Summer (n = 31) | Autumn (n = 22) | Winter (n = 20) | Year (n = 109) |
| <i>Encephalitozoon intestinalis</i> | 21 (58.3) | | | 8 (40) | 29 (26.6) |
| <i>Enterocytozoon bienersi</i> | 10 (27.7) | 3 (9.7) | | 5 (25) | 18 (16.5) |
| <i>Encephalitozoon cuniculi</i> | | | | 13 (65) | 13 (11.9) |
| <i>A. algerae</i> | 1 (2.8) | | 1 (4.5) | | 2 (1.8) |
| Undetermined | 15 (41.6) | 28 (90.3) | 21 (95.5) | 1 (5) | 65 (59.6) |

^a n, total number of microsporidian-positive samples.

Applied and Environmental Microbiology

TABLE 6 Identification of *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in water samples from the central area of Spain

| Season | Sampling point ^a | Haplotype | Group no. | Synonym | Hosts | Geographic distribution | References |
|--------|-----------------------------|-----------|-----------|---------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Spring | WWTP 1.2-R | 1 | 1 | D | Humans, pets, and wild animals | Africa, Asia, America, Europe | 24, 25, 26, 27 |
| | WWTP 1.2-F | 10 | 1 | C | Humans | Europe | 28, 29, 26, 30, 31, 27 |
| | LI 1.3 | 70 | 1 | D-like | Cats | South America | 26, 27, 32 |
| | WWTP 2-F | 10 | 1 | C | Humans | Europe | 28, 29, 26, 30, 31, 27 |
| | WWTP 4.2-F | 10 | 1 | C | Humans | Europe | 28, 29, 26, 30, 31, 27 |
| | WWTP 4.3-R | 10 | 1 | C | Humans | Europe | 28, 29, 26, 30, 31, 27 |
| | WWTP 4.3-F | 70 | 1 | D-like | Cats | South America | 26, 27, 32 |
| | LI 4 | 70 | 1 | D-like | Cats | South America | 26, 27, 32 |
| Summer | WWTP 1.2-F | 70 | 1 | D-like | Cats | South America | 26, 27, 32 |
| | DWTP 3-R | 70 | 1 | D-like | Cats | South America | 26, 27, 32 |
| | WWTP 4.3-R | 70 | 1 | D-like | Cats | South America | 26, 27, 32 |
| Winter | WWTP 1.2-R | 70 | 1 | D-like | Cats | South America | 26, 27, 32 |
| | WWTP 1.2-F | 70 | 1 | D-like | Cats | South America | 26, 27, 32 |

^a DWTP, drinking water treatment plant; WWTP, wastewater treatment plant; LI, location of influence; R, raw water; F, finished water.

transplant recipients (20), and in the immunocompetent population (39), with *Enterocytozoon bieneusi* being the most frequent species identified. All these data confirm the cosmopolitan distribution of these parasites, which are considered ubiquitous organisms widely distributed in nature, and therefore they should have several transmission modes and infection sources for humans (1). Some epidemiological studies have identified water as a risk factor in the acquisition of microsporidiosis. Hutin et al. (40) determined that the use of public pools was a risk factor associated with microsporidian infection in AIDS patients, linking the water as a possible source of infection. In a retrospective study of an outbreak of intestinal microsporidiosis in Lyon, France, water was involved as the possible transmission vehicle (6), and use of hot tubs or spas and occupational contact with water were considered risk factors for acquiring intestinal microsporidiosis in a cohort of HIV-positive people (41). Additionally, several species of microsporidia that infect humans have been documented in water samples. *Encephalitozoon intestinalis*, *Enterocytozoon bieneusi*, *A. algerae*, *Nosema* spp., *Pleistophora* spp., and *V. corneae* spores have been identified in ground, surface, and recreational waters (42).

This study presents the first data of microsporidia in surface water in the central area of Spain during a year. There is only one report done by Izquierdo et al. (10) on the presence of microsporidia in several DWTPs, WWTPs, and recreational river areas (RRAs) from Galicia (Spain). Using staining protocols, they found 21% samples of positive. Parasites were present in the influent water but not in the final effluent of DWTPs, and in one WWTP microsporidia were found in the final effluent. *Encephalitozoon intestinalis* was identified by PCR in one sample from RRAs.

In our study, microsporidian presence was analyzed in each of the four seasons of the year, and both raw and finished waters from DWTPs and WWTPs were studied in order to evaluate the elimination methods of these organisms in these plants. Microsporidian data showed a tendency to rise in spring and summer, with a higher prevalence of these parasites in both raw and finished waters from WWTPs. It is important to highlight that human-pathogenic species were found with high prevalence in these seasons and that they were present in both raw and finished waters from WWTPs and also in influent locations. Other studies

have also confirmed the presence of microsporidia in influent and effluent products of WWTPs, confirming their potential role as contaminants (3, 43, 44). With regard to seasonal variation, our results are similar to those obtained by Cheng et al. (43), who evaluated the presence of human-virulent microsporidia in wastewater treatment plants and found a seasonal increase of these parasites in April and July, both in inflowing wastewaters and in wastewater processing end products. Other authors who have studied microsporidian presence over a year-long period in water samples did not find a seasonal variation (45, 46). However, this could be possible because of the limited number of samples analyzed and also the kind of water evaluated, which included only surface water from a river (45) and water from swimming pools (46) and recreational lakes (45).

Encephalitozoon intestinalis and *Enterocytozoon bieneusi* were the most frequent microsporidian species found in our study. The high prevalence can be explained by the fact that these are the two most prevalent species, both in humans and in a wide variety of hosts, including wild and domestic mammals (47) and birds (47–49). These animals could act as reservoirs, facilitating environmental contamination, a suggestion which has been supported in several studies (49, 50). Similar to findings in human samples, *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* are the most frequent microsporidian species described in water samples (3, 51). In our study in addition to these two species, we also detected *A. algerae* and *Encephalitozoon cuniculi* spores in the water samples analyzed; we note that so far there are no data available on the presence of *E. cuniculi* in environmental samples. *E. cuniculi* showed a clear seasonal tendency as it was found in WWTPs and three LI only during winter. In the case of *A. algerae*, there is only one study on its presence in ditch water in Florida (1). Water contamination with both species is relevant because although they are most frequently associated with infections in other mammals, in the case of *Encephalitozoon cuniculi* (1), and in insects, in the case of *A. algerae* (52), they have also been reported as human pathogens. *E. cuniculi* has been associated with respiratory, ocular, urinary tract, liver, central nervous system, and disseminated infections, among others (1), while *A. algerae* can produce ocular and muscle infections (1, 52).

The high percentage of samples containing undetermined species is not surprising since it is common to find in the environment, specifically water, the presence of other microsporidian genera that are not associated with disease in humans but which can be associated with fish and numerous invertebrates, including insects (1). Using the sequence analysis of positive phylum PCR products, we were able to establish homologies of less than 95% only with microsporidia which infect insects. *O. operophterae* and *Pleistophora* sp. were identified, with only the latter being associated with human infections although less frequently than other microsporidia (53). Species of this genus have also been found in ditch water, irrigation water used for crops, and surface water (53).

Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* did not exhibit a high diversity since only three genotypes were found in the 13 samples analyzed (D-like, D, and C genotypes). These genotypes are included in group 1, according to the classification based on the phylogenetic analysis of the ITS region of the rRNA gene (26, 27, 54). This group is the most diverse of the five that have been documented and includes several genotypes isolated from humans (both HIV positive and negative), as well as from domestic and wild animals (27, 54). The D-like genotype was the most frequent in the environmental samples analyzed. Until now this genotype has been found only in South America (32), and there are no data about its presence in Europe. It is important to point out that although the D-like genotype has until now been described only in cats, we should not underestimate the importance of this genotype as an agent of human infection, taking into account that there is only one study on the molecular characterization of *E. bieneusi* in two transplant patients in Spain (20).

Genotype D has a wide geographical distribution (26, 27, 54). It has been found in many animals, including pigs, cattle, foxes, monkeys, and dogs (54); it is common in HIV-positive patients (54), but it has also been found in seronegative patients (54). In Spain, this genotype has been found in two non-HIV-infected renal transplant recipients with intestinal symptomatology (20). Genotype C has, until now, been described in humans only in Europe (29), particularly in the transplant recipient population, but in Spain there are no data about its presence in either clinical or environmental samples.

Regarding *Encephalitozoon cuniculi*, genotypes I (rabbit strain) and III (dog strain) were found in three samples from WWTPs and LI; they have been well described both in humans and animals in Europe (35). As with *Enterocytozoon bieneusi*, there is little information about the strain variability of *E. cuniculi* in Spain. In fact, to our knowledge, there has only been one study carried out by del Aguila et al. (35), who identified *E. cuniculi* type strain III (dog strain) in the urine and sputum samples from a Spanish AIDS patient based on the sequence analysis of the ITS region of the rRNA gene. Taken together, the *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon cuniculi* genotype results suggest that both humans and animals could act as contamination sources for environmental samples, supporting the zoonotic potential of both species. Moreover, our data could contribute to the knowledge of the molecular epidemiology of these microsporidia, particularly in tracing the sources of infection and therefore helping to formulate preventive and control strategies.

C. cayetanensis has been found in patients with diarrhea worldwide (2). In Europe, cases of *C. cayetanensis* infection have been reported in Spain, Italy, Greece, Germany, United Kingdom, Swit-

zerland, Sweden, France, and The Netherlands, among others, most of them associated with travel to areas of endemicity (2), although there have been a few reports of individuals without a travel history (2). Outbreaks of cyclosporiasis have also been described in Germany, Turkey, Sweden, and Spain (2), and these were usually associated either with consumption of food from developing countries or travel to areas of endemicity.

Regarding water transmission of *Cyclospora*, several studies have been conducted in countries of South America and Africa, and they have identified water as an infection source for this parasite (4, 5, 7, 55). Oocysts of the parasite have also been reported in drinking water in Guatemala, Haiti, Ghana, Vietnam, and Egypt, among others (2).

In our study, distribution of positive samples for *C. cayetanensis* showed that the highest percentage belonged to WWTPs. These findings are consistent with the results obtained from studies in Nepal and Peru (55, 56), where *Cyclospora* spp. were detected in both drinking water and wastewater. Several authors have found that water from wastewater plants used either for irrigation or for processing vegetables was contaminated with *Cyclospora* oocysts (57, 58). Different studies have confirmed the seasonality of *Cyclospora* spp. in both clinical and environmental samples. Results vary according to the region studied (5, 55, 57, 59, 60). In clinical samples, seasonal variation has been documented in the humid and rainy seasons from November to May in Indonesia, from May to September in Nepal, and from May to August in Guatemala (55, 61, 62). However, although rainfall could be influencing the presence of the parasite, studies in Peru have detected a marked seasonality in a coastal area near Lima, which is a desert region (56). Unfortunately in Spain there are no longitudinal studies that establish seasonality for *Cyclospora* spp. in clinical samples. As previously mentioned, data come from sporadic cases or outbreaks (63).

In relation to environmental samples, only a few studies have detected *Cyclospora* and evaluated its seasonal behavior. As far as we know, this is the first description of the presence of *C. cayetanensis* over the course of a year in several drinking water treatment plants (both in raw and finished waters). Although there are some studies on the presence of this coccidian throughout a year (64, 65), they have included only treated potable water from tanks (65) and finished piped water (64). *Cyclospora* seasonality varied according to the region studied, with an increase in its presence in the pre-rainy season in Hanoi (57) and the rainy season in Cambodia (58). In our work, we show a seasonal tendency of *Cyclospora* during spring (April to June), with 23% of samples positive. However, a limitation in the interpretation of these results is the lack of data about cyclosporiasis cases during the period in which the research was done. Therefore, we could not correlate the infection pattern with *C. cayetanensis* and the seasonal variation described in this paper. Additionally, it may be important to determine the *Cyclospora* species in environmental samples and to investigate these protozoa in animals other than humans, which could act as possible reservoirs. *Cyclospora*-like oocysts resembling *C. cayetanensis* oocysts have been detected in fecal samples from several animals, including dogs, chickens, ducks, and primates (66–68). In Spain, Cordon et al. (66) studied fecal samples from birds of Almuñecar (Granada) and found 4.5% of samples positive for *Cyclospora* sp.; their results showed that this coccidian was present in not only humans but also animals, suggesting a possible role of the latter in the transmission of the parasite.

It is important that both microsporidia and *Cyclospora* were less frequent in finished water than in raw water in DWTPs. In WWTPs, both influent and effluent treated water showed similar frequencies of microsporidia and *Cyclospora* sp., which may suggest that both parasites can survive the treatments used in these plants. This could be explained by the thick outer walls of the microsporidian spore and *Cyclospora* oocyst that give them a high resistance to disinfection (1, 2), and in the case of microsporidia, their small size allows them to escape filtration systems commonly used in the treatment of drinking water and wastewater (69). However, it should be noted that the viability of these parasites was not determined in this study.

Conclusions. To our knowledge this is the first report of a year-long study of *C. cayetanensis* in drinking water treatment plants. Additionally, data about the presence and molecular characterization of the human-pathogenic microsporidia in drinking water, wastewater, and locations of influence in Spain are presented. Results clearly suggest seasonality for *Cyclospora* during spring and for microsporidia in spring and summer. We describe for the first time the presence of *A. algerae* and *Encephalitozoon cuniculi* in water samples, with a marked seasonality for the latter, which was present only in winter. *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon cuniculi* genotyping results may suggest that both humans and animals are possible water contamination sources, confirming the zoonotic potential of these parasites. It is important to highlight that finished waters from DWTPs showed a lower prevalence of both parasites. Both WWTPs and LI had higher frequencies of microsporidia and *Cyclospora* spp. Molecular characterization of *Enterocytozoon bienersi* showed that the D-like genotype was the most common. It is important that although the DWTPs and WWTPs studied meet European and national regulations on water sanitary quality, both parasites, which are not included in these regulations, were found in water samples from these plants, supporting the idea that new and appropriate controls and regulations for drinking water, wastewater, and recreational waters could be proposed to avoid health risks from these pathogens.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Sergio Llorens for his valuable technical assistance and to Brian Crilly for helpful revision of the manuscript. We also thank Santiago Diaz-Parreño for his statistical advice.

This work was funded by grant PI061593 from the Instituto de Salud Carlos III (FISS). A.L.G. was supported in Spain by an overseas fellowship from Colciencias (Universidad de Antioquia, Colombia). A.M. was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (FPU grant AP2009-0415).

REFERENCES

- Didier ES, Weiss LM. 2006. Microsporidiosis: current status. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19:485–492.
- Ortega YR, Sanchez R. 2010. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clin. Microbiol. Rev.* 23:218–234.
- Dowd SE, Gerba CP, Pepper IL. 1998. Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3332–3335.
- Dowd SE, John D, Eliopolis J, Gerba CP, Naranjo J, Klein R, Lopez B, de Mejia M, Mendoza CE, Pepper IL. 2003. Confirmed detection of *Cyclospora cayetanensis*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* in water used for drinking. *J. Water Health* 1:117–123.
- Sturbaum GD, Ortega YR, Gilman RH, Sterling CR, Cabrera L, Klein DA. 1998. Detection of *Cyclospora cayetanensis* in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2284–2286.
- Cotte L, Rabodonirina M, Chapuis F, Bailly F, Bissuel F, Raynal C, Gelas P, Persat F, Piens MA, Trepo C. 1999. Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 180:2003–2008.
- Rabold JG, Hoge CW, Shlim DR, Kefford C, Rajah R, Echeverria P. 1994. *Cyclospora* outbreak associated with chlorinated drinking water. *Lancet* 344:1360–1361.
- US Environmental Protection Agency. 2005. Contaminant candidate list 2 and regulatory determinations. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/ccl2.cfm>.
- US Environmental Protection Agency. 2009. Contaminant candidate list 3. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/ccl3.cfm>.
- Izquierdo F, Castro Hermida JA, Fenoy S, Mezo M, Gonzalez-Warleta M, del Aguila C. 2011. Detection of microsporidia in drinking water, wastewater and recreational rivers. *Water Res.* 45:4837–4843.
- Magnet A, Galván AL, Fenoy S, Izquierdo F, Rueda C, Fernandez Vadillo C, Pérez-Irezábal J, Bandyopadhyay K, Visvesvara GS, da Silva AJ, del Aguila C. 2012. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitol. Res.* 111:383–392.
- US Environmental Protection Agency. 2005. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/method_1623.pdf.
- da Silva AJ, Bornay-Llinares FJ, Moura IN, Slemenda SB, Tuttle JL, Pieniazek NJ. 1999. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. *Mol. Diagn.* 4:57–64.
- DA Silva AJ, Schwartz DA, Visvesvara GS, de Moura H, Slemenda SB, Pieniazek NJ. 1996. Sensitive PCR diagnosis of Infections by *Enterocytozoon bienersi* (microsporidia) using primers based on the region coding for small-subunit rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 34:986–987.
- DA Silva AJ, Slemenda SB, Visvesvara GS, Schwartz DA, Wilcox CM, Wallace S, Pieniazek NJ. 1997. Detection of Septata intestinalis (Microsporidia) Cali et al. 1993 using polymerase chain reaction primers targeting the small subunit ribosomal RNA coding region. *Mol. Diagn.* 2:47–52.
- De Groote MA, Visvesvara G, Wilson ML, Pieniazek NJ, Slemenda SB, da Silva AJ, Leitch GJ, Bryan RT, Reves R. 1995. Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. *J. Infect. Dis.* 171:1375–1378.
- Visvesvara GS, Leitch GJ, DA Silva AJ, Croppo GP, Moura H, Wallace S, Slemenda SB, Schwartz DA, Moss D, Bryan RT, et al. 1994. Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. *J. Clin. Microbiol.* 32:2760–2768.
- Visvesvara GS, Belloso M, Moura H, DA Silva AJ, Moura IN, Leitch GJ, Schwartz DA, Chevez-Barrios P, Wallace S, Pieniazek NJ, Goosey JD. 1999. Isolation of *Nosema algerae* from the cornea of an immunocompetent patient. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46:105.
- Ghosh K, Weiss LM. 2009. Molecular diagnostic tests for microsporidia. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2009:926521. doi:10.1155/2009/926521.
- Galvan AL, Sanchez AM, Valentin MA, Henriques-Gil N, Izquierdo F, Fenoy S, del Aguila C. 2011. First cases of microsporidiosis in transplant recipients in Spain and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.* 49:1301–1306.
- Xiao L, Li L, Visvesvara GS, Moura H, Didier ES, Lal AA. 2001. Genotyping *Encephalitozoon cuniculi* by multilocus analyses of genes with repetitive sequences. *J. Clin. Microbiol.* 39:2248–2253.
- Relman DA, Schmidt TM, Gajadhar A, Sogin M, Cross J, Yoder K, Sethabutr O, Echeverria P. 1996. Molecular phylogenetic analysis of *Cyclospora*, the human intestinal pathogen, suggests that it is closely related to *Eimeria* species. *J. Infect. Dis.* 173:440–445.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95–98.
- Breton J, Bart-Delabesse E, Biligui S, Carbone A, Seiller X, Okome-Nkoumou M, Nzamba C, Kombila M, Accoceberry I, Thellier M. 2007. New highly divergent rRNA sequence among biodiverse genotypes of *En-*

- terocytozoon bienewsi* strains isolated from humans in Gabon and Cameroon. J. Clin. Microbiol. 45:2580–2589.
25. Chalifoux LV, Carville A, Pauley D, Thompson B, Lackner AA, Mansfield KG. 2000. *Enterocytozoon bienewsi* as a cause of proliferative serositis in simian immunodeficiency virus-infected immunodeficient macaques (Macaca mulatta). Arch. Pathol. Lab. Med. 124:1480–1484.
 26. Henriques-Gil N, Haro M, Izquierdo F, Fenoy S, del Aguila C. 2010. Phylogenetic approach to the variability of the microsporidian *Enterocytozoon bienewsi* and its implications for inter- and intrahost transmission. Appl. Environ. Microbiol. 76:3333–3342.
 27. Santin M, Fayer R. 2009. *Enterocytozoon bienewsi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. J. Eukaryot. Microbiol. 56:34–38.
 28. Breitenmoser AC, Mathis A, Burgi E, Weber R, Deplazes P. 1999. High prevalence of *Enterocytozoon bienewsi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans. Parasitology 118:447–453.
 29. Dengjel B, Zahler M, Hermanns W, Heinritz K, Spillmann T, Thom-schke A, Loscher T, Gothe R, Rinder H. 2001. Zoonotic potential of *Enterocytozoon bienewsi*. J. Clin. Microbiol. 39:4495–4499.
 30. Liguory O, David F, Sarfati C, Schuitema AR, Hartskeerl RA, Derouin F, Modai J, Molina JM. 1997. Diagnosis of infections caused by *Enterocytozoon bienewsi* and *Encephalitozoon intestinalis* using polymerase chain reaction in stool specimens. AIDS 11:723–726.
 31. Rinder H, Katzwinkel-Wladarsch S, Loscher T. 1997. Evidence for the existence of genetically distinct strains of *Enterocytozoon bienewsi*. Parasitol. Res. 83:670–672.
 32. Santin M, Trout JM, Vecino JA, Dubey JP, Fayer R. 2006. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienewsi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. Vet. Parasitol. 141:334–339.
 33. Sharma S, Sachdeva P, Virdi JS. 2003. Emerging water-borne pathogens. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61:424–428.
 34. del Aguila C, Lopez-Velez R, Fenoy S, Turrientes C, Cobo J, Navajas R, Visvesvara GS, Croppo GP, da Silva AJ, Pieniazek NJ. 1997. Identification of *Enterocytozoon bienewsi* spores in respiratory samples from an AIDS patient with a 2-year history of intestinal microsporidiosis. J. Clin. Microbiol. 35:1862–1866.
 35. del Aguila C, Moura H, Fenoy S, Navajas R, Lopez-Velez R, Li L, Xiao L, Leitch GJ, da Silva AJ, Pieniazek NJ, Lal AA, Visvesvara GS. 2001. In vitro culture, ultrastructure, antigenic, and molecular characterization of *Encephalitozoon cuniculi* isolated from urine and sputum samples from a Spanish patient with AIDS. J. Clin. Microbiol. 39:1105–1108.
 36. Del Aguila C, Navajas R, Gurbindo D, Ramos JT, Mellado MJ, Fenoy S, Munoz Fernandez MA, Subirats M, Ruiz J, Pieniazek NJ. 1997. Microsporidiosis in HIV-positive children in Madrid (Spain). J. Eukaryot. Microbiol. 44:84S–85S.
 37. Lopez-Velez R, Turrientes MC, Garron C, Montilla P, Navajas R, Fenoy S, del Aguila C. 1999. Microsporidiosis in travelers with diarrhea from the tropics. J. Travel Med. 6:223–227.
 38. Lores B, Lopez-Miragaya I, Arias C, Fenoy S, Torres J, del Aguila C. 2002. Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienewsi* in elderly human immunodeficiency virus-negative patients from Vigo, Spain. Clin. Infect. Dis. 34:918–921.
 39. Abreu-Acosta N, Lorenzo-Morales J, Leal-Guio Y, Coronado-Alvarez N, Foronda P, Alcoba-Florez J, Izquierdo F, Batista-Diaz N, Del Aguila C, Valladares B. 2005. *Enterocytozoon bienewsi* (microsporidia) in clinical samples from immunocompetent individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 99:848–855.
 40. Hutin YJ, Sombardier MN, Liguory O, Sarfati C, Derouin F, Modai J, Molina JM. 1998. Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. J. Infect. Dis. 178:904–907.
 41. Dascomb K, Frazer T, Clark RA, Kissinger P, Didier E. 2000. Microsporidiosis and HIV. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 24:290–292.
 42. Didier ES. 2005. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. Acta Trop. 94:61–76.
 43. Cheng HW, Lucy FE, Graczyk TK, Broaders MA, Mastitsky SE. 2011. Municipal wastewater treatment plants as removal systems and environmental sources of human-virulent microsporidian spores. Parasitol. Res. 109:595–603.
 44. Graczyk TK, Lucy FE, Mashinsky Y, Andrew Thompson RC, Koru O, da Silva AJ. 2009. Human zoonotic enteropathogens in a constructed free-surface flow wetland. Parasitol. Res. 105:423–428.
 45. Coupe S, Delabre K, Pouillot R, Houdart S, Santillana-Hayat M, Derouin F. 2006. Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienewsi* in surface water, including recreational areas: a one-year prospective study. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 47:351–359.
 46. Fournier S, Dubrou S, Liguory O, Gaussin F, Santillana-Hayat M, Sarfati C, Molina JM, Derouin F. 2002. Detection of microsporidia, cryptosporidia and *Giardia* in swimming pools: a one-year prospective study. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 33:209–213.
 47. Mathis A, Weber R, Deplazes P. 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. Clin. Microbiol. Rev. 18:423–445.
 48. Haro M, Izquierdo F, Henriques-Gil N, Andres I, Alonso F, Fenoy S, del Aguila C. 2005. First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. Appl. Environ. Microbiol. 71:3153–3157.
 49. Slodkiewicz-Kowalska A, Graczyk TK, Tamang L, Jedrzejewski S, Nowosad A, Zduniak P, Solarczyk P, Girouard AS, Majewska AC. 2006. Microsporidian species known to infect humans are present in aquatic birds: implications for transmission via water? Appl. Environ. Microbiol. 72:4540–4544.
 50. Sulaiman IM, Fayer R, Lal AA, Trout JM, Schaefer FW, III, Xiao L. 2003. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bienewsi*. Appl. Environ. Microbiol. 69:4495–4501.
 51. Sparfel JM, Sarfati C, Liguory O, Caroff B, Dumoutier N, Gueglio B, Billaud E, Raffi F, Molina JM, Miegville M, Derouin F. 1997. Detection of microsporidia and identification of *Enterocytozoon bienewsi* in surface water by filtration followed by specific PCR. J. Eukaryot. Microbiol. 44:78S.
 52. Visvesvara GS, Moura H, Leitch GJ, Schwartz DA, Xiao LX. 2005. Public health importance of *Brachiola algerae* (Microsporidia)—an emerging pathogen of humans. Folia Parasitol. (Praha) 52:83–94.
 53. Didier ES, Stovall ME, Green LC, Brindley PJ, Sestak K, Didier PJ. 2004. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. Vet. Parasitol. 126:145–166.
 54. Thellier M, Breton J. 2008. *Enterocytozoon bienewsi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. Parasite 15:349–358.
 55. Sherchand JB, Cross JH, Jimba M, Sherchand S, Shrestha MP. 1999. Study of *Cyclospora cayetanensis* in health care facilities, sewage water and green leafy vegetables in Nepal. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 30:58–63.
 56. Madico G, McDonald J, Gilman RH, Cabrera L, Sterling CR. 1997. Epidemiology and treatment of *Cyclospora cayetanensis* infection in Peruvian children. Clin. Infect. Dis. 24:977–981.
 57. Tram NT, Hoang LM, Cam PD, Chung PT, Fyfe MW, Isaac-Renton JL, Ong CS. 2008. *Cyclospora* spp. in herbs and water samples collected from markets and farms in Hanoi, Vietnam. Trop. Med. Int. Health 13:1415–1420.
 58. Vuong TA, Nguyen TT, Klank LT, Phung DC, Dalsgaard A. 2007. Faecal and protozoan parasite contamination of water spinach (*Ipomoea aquatica*) cultivated in urban wastewater in Phnom Penh, Cambodia. Trop. Med. Int. Health 12(Suppl 2):73–81.
 59. Lopez AS, Bendik JM, Alliance JY, Roberts JM, da Silva AJ, Moura IN, Arrowood MJ, Eberhard ML, Herwaldt BL. 2003. Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis* and other intestinal parasites in a community in Haiti. J. Clin. Microbiol. 41:2047–2054.
 60. Miegville M, Koubi V, Dan LC, Barbier JP, Cam PD. 2003. *Cyclospora cayetanensis* presence in aquatic surroundings in Hanoi (Vietnam). Environmental study (well water, lakes and rivers). Bull. Soc. Pathol. Exot. 96:149–152.
 61. Bern C, Hernandez B, Lopez MB, Arrowood MJ, de Mejia MA, de Merida AM, Hightower AW, Venczel L, Herwaldt BL, Klein RE. 1999. Epidemiologic studies of *Cyclospora cayetanensis* in Guatemala. Emerg. Infect. Dis. 5:766–774.
 62. Fryauff DJ, Krippner R, Prodjodipuro P, Ewald C, Kawengian S, Pegelow K, Yun T, von Heydowolf-Wehnert C, Oyofo B, Gross R. 1999. *Cyclospora cayetanensis* among expatriate and indigenous populations of West Java, Indonesia. Emerg. Infect. Dis. 5:585–588.
 63. Gascon J, Alvarez M, Eugenia Valls M, Maria Bordas J, Teresa Jimenez De Anta M, Corachan M. 2001. Cyclosporiasis: a clinical and epidemiological study in travellers with imported *Cyclospora cayetanensis* infection. Med. Clin. (Barc.) 116:461–464. (In Spanish.)
 64. el-Karamany EM, Zaher TI, el-Bahnasawy MM. 2005. Role of water in

- the transmission of cyclosporiasis in Sharkia Governorate, Egypt. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 35:953–962.
65. Elshazly AM, Elsheikha HM, Soltan DM, Mohammad KA, Morsy TA. 2007. Protozoal pollution of surface water sources in Dakahlia Governorate, Egypt. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 37:51–64.
 66. Cordon GP, Prados AH, Romero D, Moreno MS, Pontes A, Osuna A, Rosales MJ. 2009. Intestinal and haematic parasitism in the birds of the Almunecar (Granada, Spain) ornithological garden. *Vet. Parasitol.* 165: 361–366.
 67. Garcia-Lopez HL, Rodriguez-Tovar LE, Medina-De la Garza CE. 1996. Identification of *Cyclospora* in poultry. *Emerg. Infect. Dis.* 2:356–357.
 68. Li G, Xiao S, Zhou R, Li W, Wade H. 2007. Molecular characterization of *Cyclospora*-like organism from dairy cattle. *Parasitol. Res.* 100:955–961.
 69. Harrington G, Xagorarakis I, Assavasilavasukul P, Standridge J. 2003. Effect of filtration conditions on removal of emerging waterborne pathogens. *J. Am Water Works Assoc.* 95:95–104.

3.2 Estudio 2: A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain.

A. Galván^{a, c}; A. Magnet^{a,b}; F. Izquierdo^{a, b}; C. Fernández Vadillo^{a,b}; R.H. Peralta^d; S. Angulo^b, S. Fenoy^{a,b}, C. del Aguila^{a,b*}

^aLaboratorio de Parasitología. Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe. CP 28668 Boadilla del Monte, Madrid, Spain. ^bFacultad de Farmacia. Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe. CP 28668 Boadilla del Monte, Madrid, Spain. ^cEscuela de Microbiología. Grupo de Parasitología. Universidad de Antioquia, Calle 67 No. 53-108, Medellín, Colombia. ^dDepartamento de Patologia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal Fluminense. Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

Publicado en : Science of the total environment (2013),
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.053>.

Resumen

Se evaluó la presencia de *Cryptosporidium* spp. (Otoño de 2010 a verano de 2011) en varias Estaciones de Tratamiento de Agua Potable (ETAPs), Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) y piscinas naturales de la zona centro de España. Las muestras de agua se obtuvieron siguiendo el protocolo 1623 de la Agencia para la Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) y se concentraron mediante el sistema IDEXX Filtta-Max®. La presencia de *Cryptosporidium* spp. se evaluó mediante inmunofluorescencia directa (IF); PCR-RFLP para la identificación de especie, y análisis de secuencia del gen gp60 para la determinación de subtipos. De 150 muestras analizadas, 23 (15,3%) fueron positivas por IF y 40 (26,7%) por PCR, presentándose una mayor frecuencia en las EDARs (26,2 y 50,8%) y piscinas naturales (12,5 y 17,5%). Todas las muestras de las aguas tratadas de las ETAPs fueron negativas para el parásito en estudio y se observó una baja frecuencia del mismo en las aguas sometidas a tratamiento terciario en las EDARs. Las especies de *Cryptosporidium* identificadas incluyeron: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. ubiquitum*, *C. andersoni* y *C. muris*. El análisis de subtipos reveló la presencia de los alelos IbA10G2 e IeA11G3T3 de *C. hominis*. Esta es la primera descripción del subtipo IeA11G3T3 en muestras de agua a nivel mundial. La frecuencia más alta de *Cryptosporidium* se observó en invierno y primavera. No se encontró asociación con la temperatura y/o las precipitaciones. Este estudio aporta los primeros datos sobre la presencia y diversidad de *Cryptosporidium* en aguas potables, residuales y recreacionales de la zona centro de España.



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain

A. Galván^{a,c}, A. Magnet^{a,b}, F. Izquierdo^{a,b}, C. Fernández Vadillo^{a,b}, R.H. Peralta^d, S. Angulo^b, S. Fenoy^{a,b}, C. del Aguila^{a,b,*}

^a Laboratorio de Parasitología, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, CP 28668 Boadilla del Monte, Madrid, Spain

^b Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, CP 28668 Boadilla del Monte, Madrid, Spain

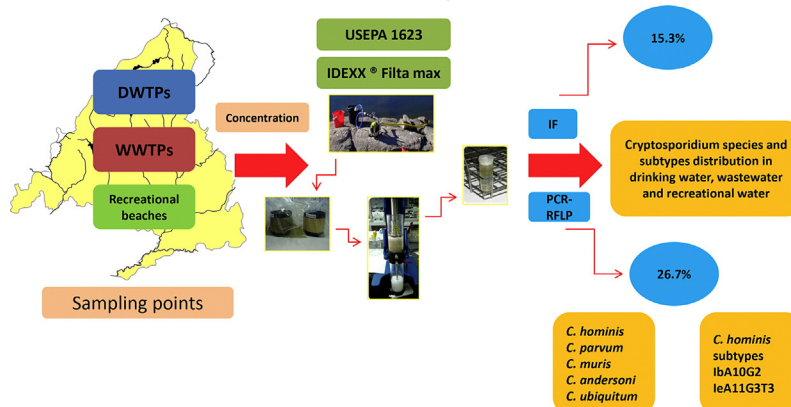
^c Escuela de Microbiología, Grupo de Parasitología, Universidad de Antioquia, Calle 67 No. 53-108, Medellín, Colombia

^d Departamento de Patología, Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

HIGHLIGHTS

- First study on *Cryptosporidium* presence in water from the central area of Spain.
- *Cryptosporidium* species were identified at the molecular level.
- The IbA10G2 subtype closely associated to waterborne outbreaks was detected.
- The IaA11G3T3 subtype is described for the first time in water samples.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2013

Received in revised form 30 July 2013

Accepted 17 August 2013

Available online xxxx

Editor: Simon James Pollard

Keywords:

Cryptosporidium spp

Drinking water treatment plant (DWTP)

Wastewater treatment plant (WWTP)

Recreational water

Spain

ABSTRACT

A year-long longitudinal study was undertaken to evaluate the presence of *Cryptosporidium* spp. in drinking water 48 treatment plants (DWTPs), wastewater treatment plants (WWTPs) and freshwater bathing beaches (FBs) from 49 the central area of Spain. Water samples were collected according to USEPA Method 1623, and concentrated by 50 the IDEXX Filta-Max® system. *Cryptosporidium* species were detected based on PCR-restriction fragment length 51 polymorphism and sequence analyses of the ssuRNA gene. *C. hominis* and/or *C. parvum* isolates were subtyped by 52 DNA sequencing of the Gp60 gene. Among 150 samples, 23 (15.3%) were positive by IFAT and 40 (26.7%) by PCR. 53 *Cryptosporidium* spp. was more frequent in WWTPs (26.2 and 50.8%) and FBs (12.5 and 17.5%) by IFAT and PCR 54 respectively. Effluent waters from DWTPs were negative for this parasite suggesting that they are suitable for public 55 use. Tertiary treatment in the WWTPs demonstrated a high removal efficiency of *Cryptosporidium* in the samples 56 evaluated. *Cryptosporidium* species identified included *C. hominis*, *C. parvum*, *C. ubiquitum*, *C. andersoni* and 57 *C. muris*. Subtyping analysis revealed *C. hominis* IbA10G2 and IaA11G3T3 alleles, which is the first report of the latter 58 in water samples. *Cryptosporidium* highest frequency was observed in winter and spring. Our data provide informa- 59 tion about the occurrence and diversity of *Cryptosporidium* in water of human use from the central area of Spain. 60

© 2013 Published by Elsevier B.V. 61

63

* Corresponding author at: Facultad de Farmacia, Urbanización Montepríncipe, 28668 Boadilla del Monte, Madrid, Spain. Tel.: +34 91 372 47 70/84; fax: +34 91 351 04 96.

E-mail addresses: agalvandiaz@yahoo.com (A. Galván), angela.magnetdavia@ceu.es (A. Magnet), ferizqui@ceu.es (F. Izquierdo), carmen.fernandezvadillo@gmail.com (C.F. Vadillo), rperalta@vm.uff.br (R.H. Peralta), sanguo@ceu.es (S. Angulo), sfenrod@ceu.es (S. Fenoy), cagupue@ceu.es (C. del Aguila).

1. Introduction

Waterborne parasitic protozoan infections have a worldwide distribution and are, in both developed and developing countries, a source for epidemic and endemic human diseases (Baldursson and Karanis, 2011). Interest in the contamination of water by enteric pathogenic protozoa has increased considerably during the past three decades and a number of human protozoan parasitic infections have been reported to be transmitted by the waterborne route (Baldursson and Karanis, 2011). *Cryptosporidium* species have emerged as major waterborne pathogens causing gastroenteritis in humans (Baldursson and Karanis, 2011). They are apicomplexa parasites that infect a variety of vertebrates including mammals, birds, reptiles, amphibians, and fish (Fayer, 2010). Currently, there are 26 valid *Cryptosporidium* species (Chalmers and Katzer, 2013). Six of them are associated as the most common important causes of human cryptosporidiosis: *C. hominis* and *C. parvum*, followed by *C. meleagridis* and occasionally *C. cuniculus*, *C. felis* and *C. canis* (Chalmers and Katzer, 2013). Cryptosporidiosis is commonly associated with enteritis and is usually characterized by acute, watery, or steatorrheic diarrhea (Putignani and Menichella, 2010). Asymptomatic infection can occur but in immunocompromised patients cryptosporidiosis may be severe, chronic, and life-threatening (Putignani and Menichella, 2010).

Cryptosporidium waterborne transmission is attributed to a number of factors that enable this parasite to survive in the environment and disseminate by water (Carmena, 2010). It has a life-cycle within a single host that excretes large numbers of immediately infective oocysts in faeces. Zoonotic transmission can occur, enhancing both the reservoir of infection and environmental contamination. *Cryptosporidium* also has small thick-walled oocysts with a low specific gravity, making them environmentally robust and facilitating their dissemination by water. Furthermore, their resistance to commonly used disinfectants in the water industry is well documented (Fayer, 2004). Outbreaks have been reported worldwide, which have been attributed to a combination of disinfectants resistance of oocysts and water treatment deficiencies that allow the passage of sufficient numbers of protozoa to cause illness (Baldursson and Karanis, 2011). Because of its waterborne transmission potential, *Cryptosporidium* has been included in the drinking water contaminant list of the U.S. Environmental Protection Agency-EPA.

Data regarding *Cryptosporidium* prevalence in the Spanish general population are scarce. There are several studies on immunocompetent population including adults and children (Clavel et al., 1996a, 1996b; Martin-Ampudia et al., 2012; Olivares et al., 2002), and also immunosuppressed individuals (Clavel et al., 1996a; Lopez-Velez et al., 1995; Navarro-i-Martinez et al., 2011). *Cryptosporidium* outbreaks have also been documented, most of them involving children (Artieda et al., 2012; Ortega et al., 2006; Rodriguez-Salinas et al., 2000) and travelers in contact with swimming pools (Galmes et al., 2003; Smerdon, 2000). Several studies have also described *Cryptosporidium* spp. in environmental samples, including drinking water (Carmena et al., 2007; Castro-Hermida et al., 2008b, 2010, 2011), wastewater (Alonso et al., 2011; Castro-Hermida et al., 2008a, 2010, 2011), recreational (Carmena et al., 2007; Castro-Hermida et al., 2008a, 2010) and surface waters (Castro-Hermida et al., 2009), sludge and biosolids (Alonso et al., 2011; Guzman et al., 2007; Reinoso and Becares, 2008). It is important to note that this protozoan has also been detected in animals including wild animals, cattle, pigs and dogs (Navarro-i-Martinez et al., 2011). All these data suggest a recurrent exposure of our population to *Cryptosporidium* and therefore imply that cryptosporidiosis could be a potential threat to public health in Spain.

Taking the above into account, and that to our knowledge there are no published data on *Cryptosporidium* occurrence in waters from the central area of Spain, this study was undertaken to evaluate the presence of *Cryptosporidium* during a 1-year survey in water samples from several drinking water treatment plants (DWTPs), wastewater treatment plants (WWTPs) and freshwater bathing beaches (FBBs) from

the Autonomous Region of Madrid (Spain) (Fig. 1). *Cryptosporidium* species and subtypes were also identified.

2. Material and methods

2.1. Study area description

Autonomous Region of Madrid (ARM) is located at the centre of the country, the Iberian Peninsula, and the Castilian Central Plateau. It has a surface area of approximately 8028 km² and a population of more than 6 million people, mostly concentrated at the metropolitan area of Madrid. ARM has a temperate continental Mediterranean climate with cold winters with temperatures sometimes dropping below 0 °C. The service, construction, and industry sectors are prominent in ARM commercial productive structure. Farm and livestock activities are less important. Currently, ARM has 13 drinking treatment plants (DWTPs) and 150 wastewater treatment plants (WWTPs) that provide service to the population. DWTPs supply system is mainly based on taking water from the seven rivers in the Sierra de Guadarrama Mountains: Alberche, Guadarrama-Aulencia, Guadalix, Manzanares, Lozoya, Jarama and Sorbe. Twenty-three WWTPs have implemented a tertiary treatment of the final effluents in their installations. Reclaimed waters generated by this treatment are suitable for public use like irrigation of green areas such as parks and golf courses. ARM has 5 fresh water bathing beaches (FBBs) officially registered in the ARM, which are only used for recreational purposes, especially during the spring and summer time.

2.2. Sampling methodology

A year long-longitudinal study from autumn 2010 to summer 2011 was designed to evaluate and characterize *Cryptosporidium* in drinking water, wastewater and recreational water from ARM. Eleven sampling points that cover 5 river basins from this region were selected; including 3 DWTPs, 3 WWTPs, and 5 FBBs (Fig. 1). Sampling was done in duplicate in every season throughout the year. For DWTPs, up to 100 liters of untreated water (influent) and treated water (final effluent) was collected. For both WWTPs and FBBs, up to 50 liters of water was collected. In every WWTP, we analysed the influent and final effluents and also the reclaimed water. A total of 150 water samples were collected using a portable water pump connected to a foam filter module, following the manufacturer's instructions and the 1623 method used by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) (EPA, 2005). Then, samples were concentrated using the IDEXX® Filta Max system according to manufacturer's instructions and the USEPA 1623 method. Recovery efficiency was determined by spiking 25 L of reagent water with *Cryptosporidium* oocysts according to the instructions of the USEPA 1623 method. This procedure was repeated four times. The mean oocyst recovery was 35.2 ± 7%, which meets the acceptance criteria described in this method. A total of 7 ml was finally eluted from each concentrated sample and fractioned for several analyses. Samples for molecular analysis were kept at −80 °C.

2.3. Immunofluorescence assay staining (IFAT) for recovered *Cryptosporidium* oocysts

Water samples were processed according to EPA method 1623. *Cryptosporidium* oocysts were isolated by immunomagnetic separation (IMS) using the Dynal IMS procedure (Dynabeads® anti-*Cryptosporidium* kit; Invitrogen Dynal AS, Oslo Norway), and detected by epifluorescence and differential interference contrast microscopy after staining with fluoresceine isothiocyanate (FITC)-labelled monoclonal antibody (Aqua-Glo™ G/C Direct kit, New Orleans) and the nucleic acid dye 4',6'-diamino-2-phenyl indole (DAPI) (Aqua-Glo™ G/C Direct kit, New Orleans). Oocyst concentration was calculated taking into account the mean recovery percentages of *Cryptosporidium* spp. oocysts obtained in

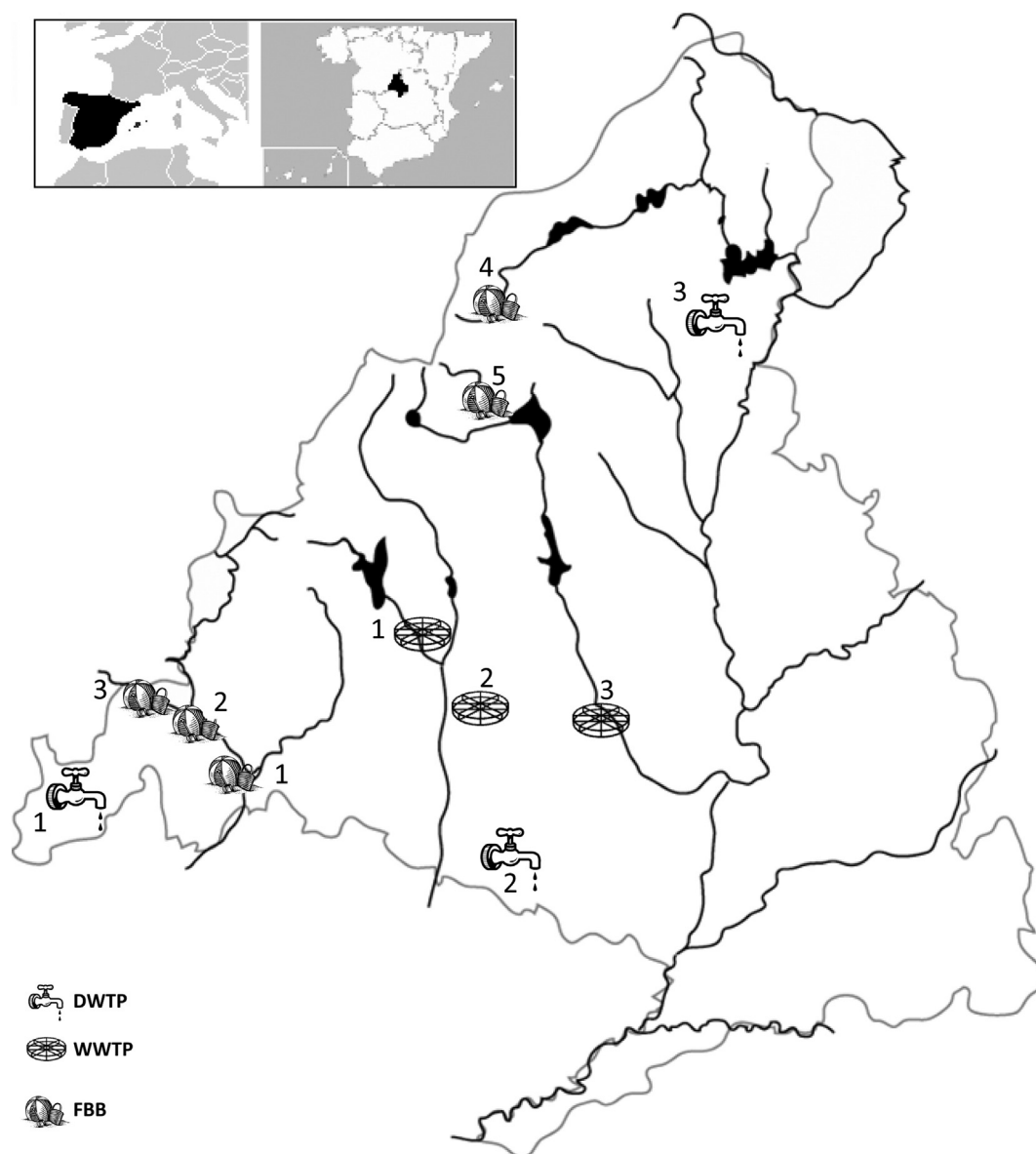


Fig. 1. Geographical location of the studied sampling points: 3 drinking water treatment plants (DWTP); 3 waste-water treatment plants (WWTP) and 5 recreational water reservoirs (FBB).

our laboratory ($35.2 \pm 7\%$) and the volume of filtered water. Positive and negative staining controls were included. Removal efficiency of *Cryptosporidium* oocysts by each treatment process both in DWTPs and WWTPs was calculated as follows: $\text{Log removal} = \text{Log}[(\text{conc. at the inlet of the process})/(\text{conc. at the outlet of the process})]$.

2.4. Molecular analysis

DNA was extracted from IMS-purified oocysts of concentrated water samples using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) and following the protocol described by Jiang et al. (2005) with slight modifications. Magnetic beads without dissociation of oocysts were used directly. Briefly: 180 μl of Buffer ATL was added to a 1.5 ml microfuge tube containing IMS-isolated *Cryptosporidium* oocysts, and vortexed for 30 s. They were then subjected to five 30 min freeze-thaw cycles at -80°C and 56°C . Twenty μl of proteinase K was added to the tubes, vortexed for 10 s, and incubated at 56°C overnight. The manufacturer-recommended protocol was followed for the remaining DNA extraction.

Cryptosporidium species were determined by a nested PCR of an approximately 830-bp fragment of the small-subunit (SSU) rRNA gene and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the secondary PCR products, using the restriction enzymes *SspI* (Fermentas, Lifescience) and *VspI* (Fermentas, Lifescience). Primers and amplification conditions used for PCR-RFLP were adopted from previous publications (Xiao et al., 1999) (A list and sequence of primers is given in supplementary data). *DdeI* enzyme (New England BioLabs Inc.) was used to differentiate between *C. muris* (224-bp, 166-bp, and 42-bp fragments) and *C. andersoni* (265-bp and 166-bp fragments) (Xiao et al., 2001). Digested products were fractionated on a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. All diagnoses were confirmed by RFLP analysis of additional, independent PCR products from the same sample. PCR second amplicon was sequenced in samples with restriction patterns undefined.

Samples that contained *C. parvum* and *C. hominis* were further subtyped by DNA sequencing of the Gp60 gene amplified by a nested PCR following the protocol described by Feng et al. (2007). Each sample was amplified at least three times (five times if the three Gp60 PCR

replicates were all negative) by PCR. We used primers LX0374 and LX0375 in the primary PCR and primers AL3532 and AL3534 in the secondary PCR (Feng et al., 2007). Gp60 products were purified according to the manufacturer's instructions using the NucleoSpin® Extract II kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany). Sequencing was carried out in both directions by the sequencing service of MACROGEN (Korea). The resulting sequences were edited and aligned with the Bioedit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 (Hall, 1999).

2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using PASW 18 (SPSS IBM) software for Windows. Differences in *Cryptosporidium* frequency between seasons were evaluated using the nonparametric Cochran and McNemar tests. Oocyst number per liter differences between raw and finished waters and between seasons was analysed by the nonparametric Friedman and Wilcoxon signed-rank tests. Temperature data normality was evaluated with the Kolmogorov–Smirnov test with the Lilliefors modification. *Cryptosporidium* presence and temperature correlation were analysed with Mann–Whitney U test or Student's t test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

A total of 150 samples were collected over a one year period from 11 sampling points that included 3 DWTPs, 3 WWTPs, and 5 FBBs (Fig. 1). Twenty-three samples (15.3%) were *Cryptosporidium* positive by IFAT; while by PCR, parasite DNA was detected in 40 samples (26.7%) (Table 1). With both techniques, *Cryptosporidium* spp. was more frequent in WWTPs and FBBs. An annual frequency of 26.2 (16/61) and 50.8% (31/61) was found in WWTPs by IFAT and PCR respectively, with almost all the positive samples corresponding to influent water, where this parasite was detected in 41.7% (10/24) of samples by IFAT and 79.1% (19/24) by PCR (Table 1). *Cryptosporidium* spp. presence was lower in effluent water from WWTPs with 25% (6/24) of samples positive by IFAT and 41.6% (10/24) positive by PCR; while in reclaimed waters, the parasite was detected only by PCR in 2 out of 13 samples (15%) (Table 1).

Table 1

Frequency, geometric mean, maximum (max) and minimum (min) numbers of *Cryptosporidium* oocysts in the influent and effluent samples from drinking water treatment plants (DWTPs) and wastewater treatment plants (WWTPs), reclaimed waters generated by tertiary treatment in WWTPs and fresh water bathing beaches from the Autonomous Region of Madrid. Results obtained by IFAT and PCR are shown.

| Sampling points | | PCR | | IFAT | <i>Cryptosporidium</i> oocyst/liter | | |
|--------------------------------|-------------------|------------|------------|------------------|-------------------------------------|-----|-----|
| | | (%) | (%) | | | | |
| | | | | | Mean \pm SD | Max | Min |
| DWTP (n: 49) | Influent (n: 24) | 2 (8.3%) | 2 (8.3%) | 0.025 \pm 0.09 | 0.4 | 0 | |
| | Effluent (n: 25) | 0 | 0 | – | – | – | |
| WWTP (n: 61) | Influent (n: 24) | 19 (79.1%) | 10 (41.7%) | 73 \pm 181 | 654.5 | 0 | |
| | Effluent (n: 24) | 10 (41.7%) | 6 (25%) | 1.2 \pm 2.48 | 9.5 | 0 | |
| | Reclaimed (n: 13) | 2 (15.4%) | 0 | – | – | – | |
| FBB (n: 40) | | 7 (17.5%) | 5 (12.5%) | 0.262 \pm 0.8 | 3.4 | 0 | |
| Number of positive samples (%) | | 40 (26.7%) | 23 (15.3%) | | | | |

#: percentage of positive samples; n: number of samples; Mean: mean concentration of *Cryptosporidium* oocysts (per liter); Min: minimum concentration of *Cryptosporidium* oocysts (per liter); Max: maximum concentration of *Cryptosporidium* oocysts (per liter); SD: Standard deviation.

The mean concentration of *Cryptosporidium* spp. oocysts per liter in influent water from WWTPs ranged from 0 to 654.5 (73 \pm 181) and 0 to 9.5 (1.2 \pm 2.48) in effluent waters (Table 1). Significant differences in oocyst concentration between influent and effluent water were not found. All samples from influent water and only 2 out of 6 (33%) of the effluent water from WWTPs were DAPI positive. Removal efficacy of *Cryptosporidium* spp. oocysts by secondary treatment in WWTPs ranged from 0.8 to 2.8 (Table 2), and it is important to point out the absence of oocysts in all the reclaimed waters from the three WWTPs evaluated in our study.

In FBBs, 12.5% (5/40) of water samples were positive by IFAT and 17.5% (7/40) by PCR (Table 1). The mean concentration of *Cryptosporidium* spp. oocysts detected was below 1 parasite per liter (0.262 \pm 0.8) (Table 1) and only 2 out of 5 (40%) positive samples had *Cryptosporidium* spp. oocyst DAPI positive. Regarding DWTPs, *Cryptosporidium* spp. was only detected in the influent water, with an annual frequency of 8.3% (2 out of 24 samples) both with IFAT and PCR (Table 1). Similar to FBBs, the mean oocyst concentration was below 1 parasite per liter (Table 1), with all of them being DAPI negative.

Distribution of results by season revealed that *Cryptosporidium* spp. was present throughout the year of the study, with a significantly higher frequency ($P < 0.05$) in winter (35.3%) and spring (20.5%) by IFAT; and winter (38.2%), summer (32.5%) and spring (25.6%) by PCR ($P < 0.05$) (Fig. 2). However, significant differences in oocyst concentration between the seasons evaluated were not found and no statistically significant correlation ($P > 0.05$) was found between *Cryptosporidium* spp. presence and temperature (Supplementary data).

In 37 out of the 40 samples that were positive for *Cryptosporidium* spp. by PCR, the species were successfully identified by the SSU rRNA-based PCR-RFLP technique. Restriction analysis and/or DNA sequencing revealed the presence of the following five species of *Cryptosporidium* in the samples evaluated (Table 3): *C. hominis* (GenBank accession number EU032325), *C. parvum* (GenBank accession number AB513880), *C. muris* (GenBank accession number AY268581), *C. andersoni* (GenBank accession number HQ009808) and *C. ubiquitum* (GenBank accession number HQ822139). *C. hominis* was the most frequent species identified with 50% (20/40) of PCR-positive samples, followed by *C. muris* with 32.5% (13/40), *C. andersoni* with 17.5% (7/40), *C. parvum* with 10% (4/40) and *C. ubiquitum* with 2.5% (1/40). Among the 40 positive samples, 6 (15%) showed the concurrent presence of two or more species of *Cryptosporidium*, the majority of which were mixed with *C. hominis* and all of them detected in waters from WWTPs (Table 3). Species could not be identified in only 3 (7.5%) of the samples (influent water from DWTP3, reclaimed water from WWTP3 and FBB2). Influent and effluent waters from WWTPs showed the highest diversity of *Cryptosporidium* species (Table 3), while only one (*C. muris*) and two (*C. andersoni* and *C. muris*) of the species found in the study were identified in DWTPs and FBBs respectively.

Table 2

Removal efficiency (removal log) of the oocyst concentration in treated waters (both secondary and tertiary treatment) from WWTPs.

| Plant ^a | WWTP | | | | | | | | | | t2.4 |
|--------------------|------------------|-------|------|--------------------------------------|-----|-----|-------------|--------------------------------------------|-----|-----|-------|
| | Oocyst per liter | | | | | | | | | | t2.5 |
| | Influent | | | Effluent (secondary treatment) | | | | Reclaimed water (Tertiary treatment) | | | t2.6 |
| | Mean | Max | Min | Mean | Max | Min | Removal log | Mean | Max | Min | t2.7 |
| 1 | 146.5 | 654.5 | 0 | 0.22 | 1.7 | 0 | 2.8 | 0 | 0 | 0 | t2.8 |
| 2 | 18 | 62.1 | 13.4 | 2.7 | 9.5 | 3.4 | 0.8 | 0 | 0 | 0 | t2.9 |
| 3 | 54.8 | 426.1 | 5.7 | 0.75 | 6 | 0 | 1.8 | 0 | 0 | 0 | t2.10 |

Mean: mean concentration of *Cryptosporidium* oocysts (per liter); Min: minimum concentration of *Cryptosporidium* oocysts (per liter) Max: maximum concentration of *Cryptosporidium* oocysts (per liter).

^a Eight samples were collected in each plant: one from influent and another from the effluent in each season

Regarding *Cryptosporidium* subtypes, samples that were positive for *C. hominis* and/or *C. parvum* were analysed. PCR and sequencing analysis of the Gp60 gene was successfully accomplished in 14 samples containing *C. hominis*. None of the *C. parvum* positive samples could be subtyped. *C. hominis* subtyping revealed the presence of two subtypes, IbA10G2 (Gene Bank accession number AY262031), which were present in 13 of the 14 samples and IaA11G3T3 (Gene Bank accession number DQ665689) which was detected in one sample in summer.

4. Discussion

This study presents the first data of *Cryptosporidium* in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain during a year-long. Distribution of positive samples for this protozoan showed that the highest percentage belonged to WWTPs followed by FBBs. However, results obtained reflect a lower occurrence of this parasite in the three types of water studied compared to the data reported in other regions in Spain (Carmena et al., 2007; Castro-Hermida et al., 2008a, 2008b, 2009, 2010, 2011; Guzman et al., 2007; Montemayor et al., 2005) and other developed countries (Smith and Nichols, 2010). Our data showed that PCR was more sensitive in the detection of *Cryptosporidium* spp. than IFAT, especially in autumn and summer (Fig. 2). However, when we analysed the results according to the sample origin, similar percentages of positivity were obtained in water samples from DWTPs and recreational water, while in water from WWTPs, PCR showed a higher number of positive samples than IFAT. Despite this, both techniques are complementary in the study of water sample contamination with this protozoan. IFAT can detect and quantify the number of *Cryptosporidium* oocysts in the water sample, whereas the PCR can identify species and subtypes of this parasite. Unfortunately, none of these methods can determine the viability and infectivity of the oocysts, so these parameters should be investigated with traditional vital stain methods or molecular methods, such as real time PCR (Kothavade, 2012).

In DWTPs we only detected *Cryptosporidium* spp. by IFAT or PCR in influent waters, with a level below 1 oocyst per 10 litres, which is the value required for the only drinking water quality regulation that includes *Cryptosporidium* spp. in Europe (DWI, 2003). According to these data, we may assume that water from the DWTPs evaluated is safe and does not represent a source of *Cryptosporidium* infection. *Cryptosporidium* spp. presence in influent water from DWTPs worldwide shows variable results, but data are usually higher than those found in

Table 3

Identification of species of *Cryptosporidium* detected in samples from drinking water treatment plants (DWTPs); wastewater treatment plants (WWTPs) and fresh water bathing beaches (FBB).

| Sample location | Species (no. of samples) | |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Influent | Effluent |
| DWTP 2 | <i>C. muris</i> (1) | |
| WWTP 1 | <i>C. hominis</i> (6); <i>C. parvum</i> (1); <i>C. muris</i> (2); <i>C. andersoni</i> (1) | <i>C. hominis</i> (2); <i>C. parvum</i> (1); <i>C. muris</i> (1); <i>C. andersoni</i> (1) |
| WWTP 2 | <i>C. hominis</i> (4); <i>C. parvum</i> (2); <i>C. muris</i> (1); <i>C. ubiquitum</i> (1) | <i>C. hominis</i> (1); <i>C. muris</i> (3) |
| WWTP 3 | <i>C. hominis</i> (5); <i>C. andersoni</i> (1) | <i>C. hominis</i> (2); <i>C. muris</i> (2) ^a |
| FBB 3 | <i>C. andersoni</i> (2); <i>C. muris</i> (1) | |
| FBB 4 | <i>C. andersoni</i> (1); <i>C. muris</i> (1) | |
| FBB5 | <i>C. andersoni</i> (1) | |

^a One sample corresponds to a reclaimed water from this plant.

our study, with frequencies ranging from 10 to 100% of positive samples, and a significant reduction of the parasite presence in finished water (Lobo et al., 2009; Moulin et al., 2010; Nichols et al., 2010). Different studies in Spain have also found higher frequencies and a higher number of oocysts per liter in the DWTPs evaluated (Carmena et al., 2007; Castro-Hermida et al., 2008b, 2010, 2011). The authors correlated these data to the predominant livestock activity that could cause water contamination through faeces and also with the small water treatment facilities used in some of these plants. DWTPs evaluated in our study have conventional water treatment procedures, which demonstrated an effective elimination of the parasite.

Regarding data on *Cryptosporidium* spp. in the WWTPs evaluated in our study, it is important to highlight that the parasite presence in effluent water was lower than that found in influent water (log reduction between 1.8 and 2.8), and even more remarkable, the absence of *Cryptosporidium* oocysts in all the reclaimed waters. Several studies on the presence of *Cryptosporidium* spp. in wastewater in Spain and other developed countries reveal a high prevalence of this parasite, and most of these studies demonstrate the inefficiency of secondary treatment in its removal (Castro-Hermida et al., 2009, 2010, 2011; Gomez-Couso et al., 2006; Montemayor et al., 2005) and in some studies worldwide, oocysts have been found even in tertiary waters (Gennaccaro et al., 2003; Levantesi et al., 2010; McCuin and Clancy, 2006). Studies in WWTPs from the USA and several European countries showed that influent and effluent waters from these plants were highly contaminated with *Cryptosporidium* (Levantesi et al., 2010; Lobo et al., 2009; Moulin

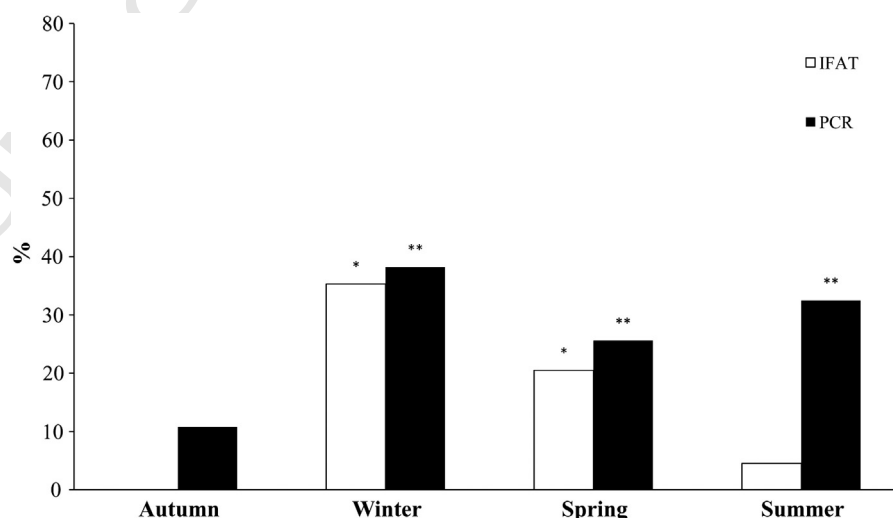


Fig. 2. *Cryptosporidium* spp. frequency according to season. Results obtained by IFAT and PCR are shown. Bars marked with one (IFAT) or two (PCR) asterisks are significantly different between each season.

et al., 2010; Nichols et al., 2010). To date, in Spain, there are only 3 published studies on the presence of *Cryptosporidium* spp. in tertiary waters from WWTPs (Montemayor et al., 2005; Rodríguez-Manzano et al., 2012; Rubiano et al., 2012). A study of *Cryptosporidium* oocysts in tertiary sewage effluent samples from Barcelona showed that 75% of these samples were *Cryptosporidium* positive (Montemayor et al., 2005). Rubiano et al. (2012) found that reclaimed waters from Barcelona treated with UV irradiation and/or chlorination did not have infectious *Cryptosporidium* oocyst above the detection limits; and Rodríguez-Manzano et al. (2012) identified viable pathogens, including *Cryptosporidium*, in the reclaimed water from WWTPs in Eastern of Spain. In our study, tertiary treatments used in the 3 WWTPs included both UV irradiation and chlorination procedures, and although there were 2 positive samples identified by PCR, in both cases DNA concentration was too low, and *Cryptosporidium* spp. oocyst presence by IFAT was not detected. These results suggest an improvement in water quality from WWTPs after a tertiary treatment and therefore this water could be considered appropriate for public use with no negative impact on public health. *Cryptosporidium* frequency in the recreational water samples evaluated in our study was lower than that found in most of the studies in Spain and worldwide (Carmena et al., 2007; Castro-Hermida et al., 2008a, 2010; Graczyk et al., 2007; Loganathan et al., 2012; Montemayor et al., 2005), which describes frequencies between 33 and 65%.

Cryptosporidium higher frequencies in DWTPs, WWTPs and recreational waters described in other studies are associated with a predominant livestock activity in the surrounding areas. In Spain several studies have detected a high prevalence of *Cryptosporidium* spp. in animals including cattle and sheep (Cardona et al., 2011; Castro-Hermida et al., 2009; Diaz et al., 2010a, 2010b; Navarro-i-Martinez et al., 2003; Quilez et al., 2008), so they can be considered as an important source of water contamination. In our study, the low number of positive samples could be explained by a reduced livestock activity in the studied area; and also, in the case of the DWTPs and recreational areas, the absence of nearby-located WWTPs that discharge wastewaters into superficial water.

Cryptosporidium spp. distribution according to season reveals its presence throughout the year, with the highest frequency in winter and a second peak observed in summer. Several studies have investigated the seasonality of this protozoan with diverse results (Carmena et al., 2007; Castro-Hermida et al., 2010; Hashimoto et al., 2001; Hogan et al., 2012; Muchiri et al., 2009), so it has not yet been defined if seasonality is a general feature of the contamination by *Cryptosporidium* spp. Different seasonal behavioral has also been described in Spain, with high frequencies detected during spring and autumn in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain (Montemayor et al., 2005); autumn and summer in drinking water supplies in northern Spain (Carmena et al., 2007); and spring and summer in drinking, wastewater, recreational and surface waters from Galicia (Castro-Hermida et al., 2008a, 2008b, 2009, 2010). *Cryptosporidium* spp. concentration in waters has also been described as elevated during periods with higher precipitation rates and colder temperatures, both of these being key elements for the entry and survival of oocysts through runoff into surface waters (Bodley-Tickell et al., 2002). In our study, no relationship between *Cryptosporidium* spp. and ambient temperature could be established. It is likely that the seasonal presence of *Cryptosporidium* spp. depends on the parasite peaks of incidence in humans or animals. In Europe, a pronounced seasonal peak was observed in the autumn of 2005, with 59% of the cases reported between August and November, although Ireland and Spain experienced a peak in spring and summer, respectively (Semenza and Nichols, 2007). Unfortunately, since the prevalence of the *Cryptosporidium* spp. infections in humans or animals was not investigated at the time of the study, any transmission link with the parasite seasonal trend observed in our study could not be determined.

Cryptosporidium species distribution in the water samples evaluated indicates that *C. hominis* was the most frequent species. It was only

found in waters from WWTPs, suggesting that humans rather than animals might be the major pollution sources. *C. parvum* was less frequent; this finding is not surprising since this species had higher frequencies in rural areas with a predominant livestock activity (Castro-Hermida et al., 2008a, 2009, 2010; Llorente et al., 2007). In Spain, both *C. hominis* and *C. parvum* are the most frequent species associated with human infections (Navarro-i-Martinez et al., 2011). Several studies have shown a higher prevalence of *C. hominis* against *C. parvum*, while others have found a predominant presence of the latter in human patients (Martin-Ampudia et al., 2012; Navarro-i-Martinez et al., 2011). Both species have been detected in water samples from Spain (Castro-Hermida et al., 2008a, 2009, 2011) and there is an extensive description of these species in waters from different countries (Baldursson and Karanis, 2011).

Surprisingly, the second most frequent species identified in our study was *C. muris*, which was detected in the 3 types of water evaluated. *C. muris* presence in Spain has been confirmed in a few studies conducted in animals including rodents in the north-east (Torres et al., 2000) and reptiles from Madrid (Pedraza-Diaz et al., 2009); and it has also been detected in the effluents from wastewater treatment plants from Galicia (Gomez-Couso et al., 2006). There are also data on *C. muris* presence in water samples worldwide (Feng et al., 2009; Lobo et al., 2009; Peng et al., 2003). In our study, *C. andersoni* was found only in recreational water reservoirs, which implies that adult cattle may play a role in water contamination, since they are the natural host of this species. Both in Spain (Castro-Hermida et al., 2008a, 2008b, 2009, 2011) and in other countries (Liu et al., 2011; Lobo et al., 2009; Nichols et al., 2010; Yang et al., 2008), this species has been identified in water samples from DWTPs, WWTPs, rivers and surface waters. Finally, *C. ubiquitum* (formerly known as cervine genotype) was identified in an influent sample from a WWTP, this being the first report of this species in water samples from Spain, although it has been described in lambs from Galicia (Diaz et al., 2010a) and recently in a 6-year-old child from Leon (Cieloszyk et al., 2012). *C. ubiquitum* has also been detected in drinking waters from Scotland (Nichols et al., 2010), a watershed in Canada (Van Dyke et al., 2012) and wastewaters in China (Liu et al., 2011). It also has a widespread distribution and a broad spectrum of hosts, including wild (Robinson et al., 2011), domestic animals (Diaz et al., 2010a; Shen et al., 2011) and humans (Chalmers et al., 2011; Elwin et al., 2012). It is important to highlight that even though *C. muris*, *C. andersoni* and *C. ubiquitum* are not considered the main pathogen species of *Cryptosporidium* for humans, they have been described occasionally as etiological agents of human infection (Xiao, 2010), especially in children and immunosuppressed patients, so its presence should be taken seriously.

Subtyping of the *C. hominis* isolates in our study indicated the allele IbA10G2 as the predominant subtype, which has a wide geographical distribution (Jex and Gasser, 2010). It was associated with the Milwaukee waterborne outbreak (Zhou et al., 2003) and it is also known to be responsible for more than half of the waterborne outbreaks around the world (Alves et al., 2003; Jex and Gasser, 2010; Peng et al., 2003). The Ib subtype family appeared to be much more virulent, being significantly associated with diarrhea, nausea, vomiting and general malaise during either the first episode of infection or all infections (Cama et al., 2007; Xiao, 2010). Subtype IaA11G3T3 was found in an influent water sample from a WWTP. This allele is the most common within the *C. hominis* subtype family le (Jex and Gasser, 2010), and in contrast to Ib subtype family, infections with le subtype have been more likely to be asymptomatic (Cama et al., 2007). Although the le subtype family has been described in humans around the world (Jex and Gasser, 2010), until now there has been only one report of this subtype family in a watershed from China, with the uncommon IaA12G3T3 allele identified (Feng et al., 2009), thus this is the first time that IaA11G3T3 subtype has been described in water samples worldwide. Our subtyping results are characteristic of the behavior of *C. hominis* in developed countries, with a small heterogeneous population, reflected by the common occurrence of subtype family Ib.

5. Conclusions

- This study highlights the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in waste-water and recreational waters from the central area of Spain.
- Tertiary treatment in the WWTPs demonstrated a high efficiency in *Cryptosporidium* oocyst removal.
- Effluent waters from DWTPs were negative for this parasite, suggesting that they are suitable for public use.
- Species distribution suggests that humans are the main contamination sources of water from WWTPs; while in recreational waters, animals should be considered as the principal sources of water pollution.
- *Cryptosporidium* spp. highest frequency was observed in winter and spring.
- Subtyping analysis identified the IbA10G2 and IaA11G3T3 alleles, which is the first report of the latter in water samples.
- In order to confirm the real potential of *Cryptosporidium* water contamination in the central area of Spain and the relevance of water in the transmission of this parasite, new studies including additional treatment plants and recreational water, as well as data on the viability and/or infectivity of the oocysts will be carried out.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.053>.

Acknowledgements

The authors are indebted to Sergio Llorens for his valuable technical assistance and to Brian Crilly for helpful revision of the manuscript. This project was supported by PS09/1115 from Instituto de Salud Carlos III (FISS), Fondos FEDER and PC15/09 and PC7/12 from San Pablo CEU Foundation. Ana Luz Galvan was supported in Spain by an overseas fellowship from Colciencias and the Antioquia University (Colombia). Angela Magnet was supported by Ministerio de Educación y Ciencia-Spain (FPU grant AP2009-0415). R.H. Peralta was supported by Research program EADS CASA-Brasil I.

References

Alonso JL, Amoros I, Canigral I. Development and evaluation of a real-time PCR assay for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage samples. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;89:1203–11.

Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Lal AA, Matos O, Antunes F. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol* 2003;41:2744–7.

Artieda J, Basterrechea M, Arriola L, Yagüe M, Albisua E, Arostegui N, et al. Outbreak of cryptosporidiosis in a child day-care centre in Gipuzkoa, Spain, October to December 2011. *Euro Surveill* 2012;17.

Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2004–2010. *Water Res* 2011;45:6603–14.

Bodley-Tickell AT, Kitchen SE, Sturdee AP. Occurrence of *Cryptosporidium* in agricultural surface waters during an annual farming cycle in lowland UK. *Water Res* 2002;36:1880–6.

Cama VA, Ross JM, Crawford S, Kawai V, Chavez-Valdez R, Vargas D, et al. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J Infect Dis* 2007;196:684–91.

Cardona GA, Carabin H, Goni P, Arriola L, Robinson G, Fernandez-Crespo JC, et al. Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Alava, North of Spain. *Sci Total Environ* 2011;412–413:101–8.

Carmena D. Waterborne transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection, surveillance and implications for public health. In: Méndez-Vilas A, editor. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology 1*. Badajoz; 2010. p. 3–14.

Carmena D, Aguinalde X, Zigorraga C, Fernandez-Crespo JC, Ocio JA. Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. *J Appl Microbiol* 2007;102:619–29.

Castro-Hermida JA, García-Présedo I, Almeida A, Gonzalez-Warleta M, Correia Da Costa JM, Mezo M. Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational

river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Water Res* 2008a;42:3528–38.

Castro-Hermida JA, García-Présedo I, Almeida A, Gonzalez-Warleta M, Correia Da Costa JM, Mezo M. Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water. *Sci Total Environ* 2008b;405:45–53.

Castro-Hermida JA, García-Présedo I, Almeida A, Gonzalez-Warleta M, Correia Da Costa JM, Mezo M. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain). *Sci Total Environ* 2011;409:2451–9.

Castro-Hermida JA, García-Présedo I, Almeida A, Gonzalez-Warleta M, Da Costa JM, Mezo M. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: a health risk for humans and animals. *Water Res* 2009;43:4133–42.

Castro-Hermida JA, García-Présedo I, Gonzalez-Warleta M, Mezo M. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. *Water Res* 2010;44:5887–96.

Cieloszyk J, Goni P, García A, Remacha MA, Sánchez E, Clavel A. Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2012.

Clavel A, Arnal AC, Sánchez EC. Respiratory cryptosporidiosis: case series and review of the literature. *Infection* 1996a;24:341–6.

Clavel A, Olivares JL, Fleita J, Castillo J, Varela M, Ramos FJ, et al. Seasonality of cryptosporidiosis in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996b;15:77–9.

Chalmers RM, Katzer F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol* 2013;29:237–51.

Chalmers RM, Smith R, Elwin K, Clifton-Hadley FA, Giles M. Epidemiology of anthroponotic and zoonotic human cryptosporidiosis in England and Wales, 2004–2006. *Epidemiol Infect* 2011;139:700–12.

Díaz P, Quilez J, Chalmers RM, Panadero R, Lopez C, Sanchez-Acedo C, et al. Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). *Parasitology* 2010a;137:1187–93.

Díaz P, Quilez J, Robinson G, Chalmers RM, Díez-Banos P, Morondo P. Identification of *Cryptosporidium* xiaoi in diarrhoeic goat kids (*Capra hircus*) in Spain. *Vet Parasitol* 2010b;172:132–4.

DWI. Guidance for the monitoring of *Cryptosporidium* in treated water supplies in Northern Ireland; 2003.

Elwin K, Hadfield SJ, Robinson G, Chalmers RM. The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000–2008. *Epidemiol Infect* 2012;140:673–83.

EPA. Environmental Protection Agency U.S. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA; 2005.

Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol* 2004;126:37–56.

Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol* 2010;124:90–7.

Feng Y, Alderisio KA, Yang W, Blancero LA, Kuhne WG, Nadareski CA, et al. *Cryptosporidium* genotypes in wildlife from a New York watershed. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:6475–83.

Feng Y, Li N, Duan L, Xiao L. *Cryptosporidium* genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique *Cryptosporidium hominis* transmission. *J Clin Microbiol* 2009;47:153–7.

Galmes A, Nicolau A, Arbona G, Smith-Palmer A, Hernandez Pezzi G, Soler P. Cryptosporidiosis outbreak in British tourist who stayed at a hotel in Majorca, Spain. *Eurosurveillance*; 2003.

Gennaccaro AL, McLaughlin MR, Quintero-Betancourt W, Huffman DE, Rose JB. Infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in final reclaimed effluent. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:4983–4.

Gomez-Couso H, Mendez-Hermida F, Castro-Hermida JA, Ares-Mazas E. *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. *J Food Prot* 2006;69:185–90.

Graczyk TK, Sunderland D, Tamang L, Lucy FE, Breyse PN. Bather density and levels of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and pathogenic microsporidian spores in recreational bathing water. *Parasitol Res* 2007;101:1729–31.

Guzman C, Jofre J, Montemayor M, Lucena F. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *J Appl Microbiol* 2007;103:2420–9.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser* 1999;41:95–8.

Hashimoto A, Hirata T, Kunikane S. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in a conventional water purification plant. *Water Sci Technol* 2001;43:89–92.

Helmi K, Skrabler S, Burnet JB, Leblanc L, Hoffmann L, Cauchie HM. Two-year monitoring of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* occurrence in a recreational and drinking water reservoir using standard microscopic and molecular biology techniques. *Environ Monit Assess* 2011;179:163–75.

Hogan JN, Daniels ME, Watson FG, Conrad PA, Oates SC, Miller MA, et al. Longitudinal Poisson regression to evaluate the epidemiology of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and fecal indicator bacteria in coastal California wetlands. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:3606–13.

Jex AR, Gasser RB. Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies—research review. *Biotechnol Adv* 2010;28:17–26.

Jiang J, Alderisio KA, Singh A, Xiao L. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:1135–41.

Kothavade RJ. Potential molecular tools for assessing the public health risk associated with waterborne *Cryptosporidium* oocysts. *J Med Microbiol* 2012;61:1039–51.

Levantesi C, La Mantia R, Masciopinto C, Bockelmann U, Ayuso-Gabella MN, Salgot M, et al. Quantification of pathogenic microorganisms and microbial indicators in three wastewater reclamation and managed aquifer recharge facilities in Europe. *Sci Total Environ* 2010;408:4923–30.

- 657 Liu A, Ji H, Wang E, Liu J, Xiao L, Shen Y, et al. Molecular identification and distribution of
658 Cryptosporidium and Giardia duodenalis in raw urban wastewater in Harbin, China.
659 Parasitol Res 2011;109:913–8.
- 660 Lobo ML, Xiao L, Antunes F, Matos O. Occurrence of Cryptosporidium and Giardia
661 genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. Lett Appl Microbiol
662 2009;48:732–7.
- 663 Loganathan S, Yang R, Bath A, Gordon C, Ryan U. Prevalence of Cryptosporidium species in
664 recreational versus non-recreational water sources. Exp Parasitol 2012.
- 665 Lopez-Velez R, Tarazona R, Garcia Camacho A, Gomez-Mampaso E, Guerrero A, Moreira V,
666 et al. Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients. Eur J Clin
667 Microbiol Infect Dis 1995;14:677–81.
- 668 Llorente MT, Clavel A, Goni MP, Varea M, Seral C, Becerril R, et al. Genetic characterization
669 of Cryptosporidium species from humans in Spain. Parasitol Int 2007;56:201–5.
- 670 Martin-Ampudia M, Mariscal A, Lopez-Gigosos RM, Mora L, Fernandez-Crehuet J.
671 Under-notification of cryptosporidiosis by routine clinical and laboratory practices
672 among non-hospitalised children with acute diarrhoea in Southern Spain. Infection
673 2012;40:113–9.
- 674 McQuinn RM, Clancy JL. Occurrence of Cryptosporidium oocysts in US wastewaters. J Water
675 Health 2006;4:437–52.
- 676 Montemayor M, Valero F, Jofre J, Lucena F. Occurrence of Cryptosporidium spp. oocysts in
677 raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. J Appl Microbiol
678 2005;99:1455–62.
- 679 Moulin L, Richard F, Stefania S, Goulet M, Gosselin S, Goncalves A, et al. Contribution of
680 treated wastewater to the microbiological quality of Seine River in Paris. Water Res
681 2010;44:5222–31.
- 682 Muchiri JM, Ascolillo L, Mugambi M, Mutwiri T, Ward HD, Naumova EN, et al. Seasonality
683 of Cryptosporidium oocyst detection in surface waters of Meru, Kenya as determined
684 by two isolation methods followed by PCR. J Water Health 2009;7:67–75.
- 685 Navarro-i-Martinez L, Bornay-Llinares FJ, Rueda C, del Aguila C, da Silva AJ, Oleaga A, et al.
686 Molecular characterization of Cryptosporidium sp. from animals in Spain. J Eukaryot
687 Microbiol 2003;50:553–4. [Suppl.].
- 688 Navarro-i-Martinez L, del Aguila C, Bornay-Llinares FJ. Cryptosporidium: a genus in
689 revision. The situation in Spain. Enferm Infecc Microbiol Clin 2011;29:135–43.
- 690 Nichols RA, Connelly L, Sullivan CB, Smith HV. Identification of Cryptosporidium species
691 and genotypes in Scottish raw and drinking waters during a one-year monitoring
692 period. Appl Environ Microbiol 2010;76:5977–86.
- 693 Olivares JL, Fernandez R, Fleta J, Ruiz MY, Clavel A. Vitamin B12 and folic acid in children
694 with intestinal parasitic infection. J Am Coll Nutr 2002;21:109–13.
- 695 Ortega M, Vergara A, Guimbao J, Clavel A, Gavin P, Ruiz A. Brote de diarrea y transmisión
696 de Cryptosporidium hominis asociados al uso de pañal en niños. Med Clin (Barc).
697 2006;127:653–6.
- 698 Pedraza-Diaz S, Ortega-Mora LM, Carrion BA, Navarro V, Gomez-Bautista M. Molecular
699 characterisation of Cryptosporidium isolates from pet reptiles. Vet Parasitol
700 2009;160:204–10.
- 701 Peng MM, Wilson ML, Holland RE, Meshnick SR, Lal AA, Xiao L. Genetic diversity of Cryptosporidium spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. Parasitol Res 2003;90:175–80.
- 702 Putignani L, Menichella D. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen cryptosporidium. Interdisc Perspect Infect Dis 2010. [2010].
- 703
- 704
- 705
- 706 Quilez J, Torres E, Chalmers RM, Robinson G, Del Cacho E, Sanchez-Acedo C. Cryptosporidium species and subtype analysis from dairy calves in Spain. Parasitology 2008;135: 707 1613–20. 708
- 709 Reinoso R, Becares E. The occurrence of intestinal parasites in swine slurry and their removal in activated sludge plants. Bioresour Technol 2008;99:6661–5. 710
- 711 Robertson LJ, Gjerde B. Occurrence of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts in raw waters in Norway. Scand J Public Health 2001;29:200–7. 712
- 713 Robinson G, Chalmers RM, Stapleton C, Palmer SR, Watkins J, Francis C, et al. A whole water catchment approach to investigating the origin and distribution of Cryptosporidium species. J Appl Microbiol 2011;111:717–30. 714 715
- 716 Rodriguez-Manzano J, Alonso JL, Ferrus MA, Moreno Y, Amoros I, Calgua B, et al. Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water. Water Sci Technol 2012;66: 717 2517–23. 718 719
- 720 Rodriguez-Salinas P, Aragon Pena A, Allue T, Lopez Perez M, Jimenez M, Dominguez Rodriguez M. Outbreak of cryptosporidiosis in Guadarrama (Autonomous Community of Madrid). Rev Esp Salud Publica 2000;74:527–36. 721 722
- 723 Rubiano ME, Agullo-Barcelo M, Casas-Mangas R, Jofre J, Lucena F. Assessing the effects of tertiary treated wastewater reuse on a Mediterranean river (Llobregat, NE Spain), part III: pathogens and indicators. Environ Sci Pollut Res Int 2012;19:1026–32. 724 725
- 726 Semenza JC, Nichols G. Cryptosporidiosis surveillance and water-borne outbreaks in Europe. Euro Surveill 2007;12:E13–4. 727
- 728 Shen Y, Yin J, Yuan Z, Lu W, Xu Y, Xiao L, et al. The identification of the Cryptosporidium ubiquitum in pre-weaned Ovines from Aba Tibetan and Qiang autonomous prefecture in China. Biomed Environ Sci 2011;24:315–20. 729 730
- 731 Smerdon W. Cryptosporidiosis outbreak associated with Majorcan hotel. 4Eurosveillance; 2000. 732
- 733 Smith HV, Nichols RA. Cryptosporidium: detection in water and food. Exp Parasitol 2010;124:61–79. 734
- 735 Torres J, Gracenea M, Gomez MS, Arribasbalaga A, Gonzalez-Moreno O. The occurrence of Cryptosporidium parvum and C. muris in wild rodents and insectivores in Spain. Vet Parasitol 2000;92:253–60. 736 737
- 738 Van Dyke MI, Ong CS, Prystajek NA, Isaac-Renton JL, Huck PM. Identifying host sources, human health risk and indicators of Cryptosporidium and Giardia in a Canadian watershed influenced by urban and rural activities. J Water Health 2012;10:311–23. 739 740
- 741 Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. Exp Parasitol 2010;124: 742 80–9. 743
- 744 Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, et al. Phylogenetic analysis of Cryptosporidium parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. Appl Environ Microbiol 1999;65:1578–83. 745
- 746 Xiao L, Singh A, Limor J, Graczyk TK, Gradus S, Lal A. Molecular characterization of cryptosporidium oocysts in samples of raw surface water and wastewater. Appl Environ Microbiol 2001;67:1097–101. 747 748
- 749 Yang W, Chen P, Villegas EN, Landy RB, Kanetsky C, Cama V, et al. Cryptosporidium source tracking in the Potomac River watershed. Appl Environ Microbiol 2008;74: 750 6495–504. 751
- 752 Zhou L, Singh A, Jiang J, Xiao L. Molecular surveillance of Cryptosporidium spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. J Clin Microbiol 2003;41:5254–7. 753 754 755

Supplementary table 1. List of primers used in this study.

| | | Primer | Sequence (5' to 3') | Reference |
|--------------------------------|---------------|------------------|----------------------------|---------------------|
| <i>Cryptosporidium</i> spp. | Primary PCR | Forward | TTCTAGAGCTAATACATGCG | (Xiao et al., 1999) |
| | | Reverse | CCCTAATCCTTCGAAACAGGA | |
| | Secondary PCR | Forward | GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG | |
| | | Reverse | AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA | |
| <i>Cryptosporidium</i> subtype | Primary PCR | Forward (LX0374) | TTACTCTCCGTTATAGTCTCC | (Feng et al., 2007) |
| | | Reverse (LX0375) | GGAAGGAACGATGTATCTGA | |
| | Secondary PCR | Forward (AL3532) | TCCGCTGTATTCTCAGCC | |
| | | Reverse (AL3534) | GCAGAGGAACCAGCATC | |

Supplementary table 2. Ambient temperature data throughout the year of study^a.

| Sample location | Ambient temperature (°C) | | | | | | | |
|-----------------|--------------------------|-----|---------------------|------|---------------------|------|---------------------|------|
| | Autumn ^b | | Winter ^b | | Spring ^b | | Summer ^b | |
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| DWTP | | | | | | | | |
| 1 | 14 | 7 | 7 | 9 | 5.5 | 10 | 20 | 13.5 |
| 2 | 10 | 4.5 | 21 | 4.5 | 11 | 18 | 21 | 12 |
| 3 | 12 | 3.0 | 5 | 4 | 13 | 11 | 22 | 21 |
| WWTP | | | | | | | | |
| 1 | 25 | 13 | 19 | 18 | 8 | 23.5 | 32 | 26 |
| 2 | 5 | 6 | 7 | 8 | 23 | 20 | 29 | 28.5 |
| 3 | 2.5 | 4 | 2.5 | 9 | 16.5 | 14 | 25 | 25 |
| FBB | | | | | | | | |
| 1 | 16 | 17 | 10 | 13.5 | 3.5 | 17 | 27 | 19 |
| 2 | 20 | 8 | 1.5 | 10.5 | 21.5 | 28 | 29 | 23 |
| 3 | 23 | 11 | 6.5 | 10.5 | 22 | 25 | 32.5 | 26 |
| 4 | 26 | 6 | -2.5 | 8.5 | 17 | 30 | 27 | 19 |
| 5 | 18 | 3 | 12 | 5 | 17.5 | 14 | 30 | 28 |

^a There was no correlation between oocyst concentration and ambient temperature ($P>0.05$).

^b Sampling in each season was done in duplicate.

DWTP: drinking water treatment plant; WWTP: wastewater treatment plant; FBB: fresh water bathing beaches.

3.3 Estudio 3: Molecular detection of microsporidia in domestic, farm and wild animals from Spain reveals the presence of potentially human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes.

Ana Luz Galván^{a,b}; Angela Magnet^a; Soledad Fenoy^a; Nuno Henriques-Gil^c; María Haro^d; Francisco Ponce Gordo^e; Guadalupe Miró^f; Carmen del Águila^a and Fernando Izquierdo^a.

^aLaboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, CP 28668, Boadilla del Monte, Madrid, Spain.

^bEscuela de Microbiología. Grupo de Parasitología. Universidad de Antioquia, Calle 67 No. 53-108, Medellín, Colombia. ^cLaboratorio de Genética, Facultad de

Medicina, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, CP 28668, Boadilla del Monte, Madrid, Spain.^d Facultad de Farmacia, Universidad San

Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, CP 28668, Boadilla del Monte, Madrid, Spain. ^eDepartamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad

Complutense de Madrid, Pza. Ramón y Cajal s/n, Ciudad Universitaria s/n, 28040, Madrid, Spain.^fDepartamento de Sanidad Animal, Facultad de

Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

Resumen

Se evaluó la presencia de microsporidios en muestras fecales de animales domésticos (perros y gatos), de granja (cerdos, conejos y avestruces) y silvestres (zorros) de diferentes comunidades de España, mediante la tinción de tricrómico modificado y PCR para la identificación de especies. Adicionalmente se realizó la caracterización genotípica de las muestras positivas mediante el análisis de secuencia de marcadores polimórficos. De 159 muestras analizadas, 85 (53%) y 24 (28%) fueron positivas para microsporidios mediante tinción y PCR respectivamente, lo cual indica una alta frecuencia, máxime si se tiene en cuenta que las muestras analizadas no presentaban evidencias de afección intestinal. *E. bieneusi* (83%) y *E. intestinalis* (17%) fueron las únicas especies identificadas, Y se describe por primera vez su presencia en avestruces. El análisis de la secuencia de la región ITS del ADN de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSU-RNA) permitió la identificación de los siguientes genotipos de *E. bieneusi*: A (perros), I (cerdos), D (conejos y zorros) y tipo IV (avestruces). Nuestros resultados demuestran la presencia de microsporidios en una variedad de hospedadores animales en España, lo que sugiere un papel de los mismos en la transmisión de esta parasitosis, actuando como fuentes potenciales de infección para humanos y como agentes contaminantes de muestras ambientales.

Molecular detection of microsporidia in domestic, farm and wild animals from Spain reveals the presence of potentially human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes.

Ana Luz Galván^{a,b}; Angela Magnet^a; Soledad Fenoy^a; Nuno Henriques-Gil^c; María Haro^d; Francisco Ponce Gordo^e; Guadalupe Miró^f; Carmen del Águila^a and Fernando Izquierdo^a.

^aLaboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, CP 28668, Boadilla del Monte, Madrid, Spain. ^bEscuela de Microbiología. Grupo de Parasitología. Universidad de Antioquia, Calle 67 No. 53-108, Medellín, Colombia. ^cLaboratorio de Genética, Facultad de Medicina, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, CP 28668, Boadilla del Monte, Madrid, Spain. ^d Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, CP 28668, Boadilla del Monte, Madrid, Spain. ^eDepartamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Pza. Ramón y Cajal s/n, Ciudad Universitaria s/n, 28040, Madrid, Spain. ^fDepartamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

E-mail addresses

Ana Luz Galván: agalvandiaz@yahoo.com; Angela Magnet: angela.magnetdavila@ceu.es; Soledad Fenoy: sfenrod@ceu.es; Nuno Henriques-Gil: nhengil@ceu.es; María Haro: maria.harogarcia@ceu.es; Francisco Ponce Gordo: pponce@farm.ucm.es; Guadalupe Miró: gmiro@vet.ucm.es; Carmen del Águila: cagupue@ceu.es; Fernando Izquierdo: ferizqui@ceu.es.

*Corresponding author: Fernando Izquierdo PhD, Facultad de Farmacia, Urbanización Montepríncipe, CP 28668, Boadilla del Monte, Madrid, Spain. Telephone: 34.91.372.47.70/84; Fax: 34.91.351.04.96.; e-mail: ferizqui@ceu.es.

Abstract

Microsporidia are ubiquitous parasites in nature infecting all animal phyla. There are evidences that support the zoonotic potential of these parasites. Faecal samples taken from domestic (dogs and cats), farm (pigs, rabbits and ostriches) and wild animals (foxes) from different provinces of Spain were evaluated for microsporidia infection by light microscopy and PCR. After Microsporidia species identification, *E. bieneusi* genotypes were additionally studied by sequence analysis of the ITS region. Eighty-five samples of a total of 159 (53%) tested positive for microsporidia by Weber's stain and 24 (28%) were confirmed by PCR. This is a notably high frequency of positives in both domestic and farm animals, given that animals studied did not have intestinal symptoms. *E. bieneusi* and *E. intestinalis* were the only microsporidia species identified. We report the first diagnosis of *E. intestinalis* and *E. bieneusi* in ostriches and provide new information on molecular characterization of *E. bieneusi* isolates both in rabbits and ostriches. All of the *E. bieneusi* genotypes identified belonged to the zoonotic group of genotypes (Group I) including genotypes A (dogs), I (pigs), D (rabbits and foxes) and type IV (ostriches). Our results demonstrate that microsporidia are present in domestic, farm and wild animals in Spain, corroborating their potential role as a source of human infection and probably environmental contamination.

INTRODUCTION

Microsporidia are a ubiquitous group of obligate intracellular parasites that infect all major animal groups (both vertebrates and invertebrates). Transmission occurs mainly through fecal-oral routes, with sources of infection including other infected humans and animals [1], contaminated water [2,3,4], and food [1]. Thus far, at least 14 microsporidian species are considered to be pathogenic for humans, being *Enterocytozoon bieneusi* the most prevalent species in humans world-wide and

Encephalitozoon intestinalis the second one [1,5,6,7]. Gastrointestinal tract is the main localization of these parasites with chronic diarrhea as the most frequent clinical manifestation.

Several microsporidia species have been confirmed in a broad range of animals [8,9], suggesting a zoonotic potential. Although the epidemiology of microsporidian infections still remains unclear, application of molecular techniques based on PCR and sequence analysis, both for species identification and within-species genotyping, has increased the available information of microsporidia genetic diversity and it also has proven to be useful in the identification of route(s) and source(s) of transmission of these parasites. In the case of *E. bieneusi*, sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region have revealed a considerable genetic variation within *E. bieneusi* isolates of human and animal origins, with more than 100 genotypes described so far [7,9,10,11]. These studies have identified *E. bieneusi* genotypes host-associated to several animals and also some genotypes with no host specificity, which are considered zoonotic [12,13,14]. Henriques-Gil *et al.* [15] identified 4 groups (I-IV) of genotypes strongly differentiated from each other. Group I (zoonotic group) included most of the published sequences (94%), with genotypes that are associated with nearly all human infections [15]. The occasional sequences included in the divergent groups II, III, and IV are so far restricted to specific hosts such as raccoons (III) and dogs and cats (IV).

In Spain, microsporidia have been confirmed in humans, animals and environmental samples, indicating that these parasites could be more frequent than previously thought and that they should be considered as a potential public health problem. Both immunocompromised and immunocompetent population are affected with this infection, with data on microsporidia presense not only in HIV/AIDS patients [16,17,18] but also in HIV-negative patients including travelers [19], elderly people [20], organ transplant recipients [21], Crohn's disease patients [22] and immunocompetent population [23]. Similar to data described worldwide, *E. bieneusi* is the species most frequently identified. Animals hosts including dogs,

goats and rabbits [24,25], pigeons [26,27] and soil and faecal samples (presumably from dogs and cats) from urban parks [28] have been also described for microsporidia in several regions of Spain, with *E. bienersi* and *E. hellem* as the species identified. All these data suggest that human pathogenic microsporidia circulate in nature in Spain and support the idea that the most frequent microsporidia associated with human infection are of zoonotic origin.

In this study we investigate the presence of microsporidia spores in faecal samples from domestic and wild animals from Spain using microscopic and molecular methods. Additionally, taking into account that there are a few data on molecular characterization of microsporidia in animal samples in the country, we also studied the genetic diversity of *E. bienersi* from animal sources including domestic (dogs and cats), farm (pigs, rabbits and ostriches) and wild animals (foxes), through the sequence analysis of the ITS region. Our results could contribute to the knowledge of the molecular epidemiology of this microsporidia in Spain.

MATERIAL AND METHODS

Animal stool samples and staining method

A total of 159 faecal samples from domestic (dogs and cats), farm (rabbits, pigs and ostriches) and wild (foxes) animals from different autonomous communities of Spain were evaluated for the presence of microsporidia (Figure 1). All samples were apparently normal with no signs of intestinal dysfunction. The samples were stained with Weber's chromotrope stain [29]. Microscopic analysis was done with a magnification of 1000 X and positive criteria included spores with a bright pinkish red stain and either a clear vacuole-like polar end or a belt-like stripe in the middle of the spore.

DNA extraction and purification

DNA from faecal samples that were positive for microsporidia with the staining method was extracted by bead disruption of spores using the Fast-DNA-Spin soil kit according to the protocol described by Da Silva *et al* [30]. PCR inhibitors were removed by using NucleoSpin® Extract II kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Species identification by PCR

PCR was performed by using different diagnostic primer pairs. Generic microsporidia primers pairs MicR1 and MicF1 were used to confirm the presence of microsporidia [31]; microsporidial small subunit rRNA (SSU-rRNA) coding regions were amplified using the following species-specific primers: EBIEF1/EBIER1 for *E. bieneusi* [32], SINTF/SINTR for *E. intestinalis* [33], ECUNF/ECUNR for *E. cuniculi* [34], and EHELF/EHELRL for *E. hellem* [35]. The PCR amplifications were done with a GenAmp kit (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) according to the manufacturer's procedures with final concentration of 0.2 mM of each dNTP, 0.2 µM of each primer, buffer with MgCl₂ 1X and 1.25 U of *Taq* polymerase. PCR was performed in a Gene Amp ® PCR system 9700 thermocycler (Perkin Elmer) following the amplification protocol described for each species.

E. bieneusi genotyping

E. bieneusi genotyping was performed by sequence analysis of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region of rDNA. For this purpose, a fragment of 536 bp containing the 243 bp of the ITS was amplified according to the conditions described by Galván *et al.* [21].

DNA sequence analysis

PCR product was purified with QIAquick PCR kit (Qiagen, Chatsworth, CA) and sequenced on both directions through *Macrogen* laboratories (Korea) sequencing service. The resulting sequences were edited and aligned with the Bioedit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 [36].

RESULTS AND DISCUSSION

Eighty-five samples of the 159 (53%) tested positive for microsporidia by Weber's stain and 24 (28%) were confirmed by PCR. Considering that the samples had no evidences of any digestive disfunction, this is a notably high frequency of positives in both domestic and farm animals. *Enterocytozoon bieneusi* (83%) and *E. intestinalis* (17%) were the only species identified (Table 1). Most of the samples were infected by a single species, and only 2 pigs had co-infection. *Enterocytozoon bieneusi* high frequency is not surprising since a large variety of vertebrate hosts

are known to be infected by this species, including humans, other mammals and birds. Consequently, any of them may act as potential reservoirs that facilitate the environmental pollution and the continuous transmission of this microsporidia [9]. In the case of *E. intestinalis*, despite being one of the most common microsporidial species found in humans worldwide, it has been less frequently identified in host animals compared to *E. bieneusi* [8]. In our study, even though the number of animals evaluated and positive samples for *E. intestinalis* was lower, the data obtained confirm its presence in domestic animals like cats and pigs, and contribute to the current knowledge of the spectrum of animals host for this parasite, increasing the number of potential sources of infection for humans. It is also important to highlight that, to our knowledge this is the first diagnosis of *E. intestinalis* and *E. bieneusi* in ostriches, since the only microsporidian reports in the literature was *E. hellem* [37,38].

Enterocytozoon bieneusi is a complex species with multiple genotypes and diverse hosts range and pathogenicity [7,9]. The genetic data about *E. bieneusi* diversity rely almost exclusively on the analysis of the ITS region, which provides valuable information about the transmission and pathogenic potential of this parasite. In our study, the sequence analysis of this region showed 4 distinct genotypes (Table 1). All of the genotypes belonged to Group I as previously defined by Henriques-Gil *et al* [15]. In the case of dogs, all *E. bieneusi* positive samples (7) had genotype A (GenBank accession no. AF101197), which has long been known as a human specific genotype [9,11], with only one report of its presence in birds from the Czech Republic [39]. Therefore this is the first finding of this genotype in domestic dogs, which indicates that domestic animals can also be infected from a human source. Indeed, other studies have revealed a diverse group of genotypes for *E. bieneusi* isolated from dogs, cats and other pets occasionally analyzed. Zoonotic transmission between dogs and humans is possible for genotypes D, Peru6, WL11, type IV [9,40] and, according to our findings, also for the genotype A. By contrast a dog-specific genotype, PtEb IX [9,11] corresponding to the group II of

sequences that are divergent to the vast majority of *E. bieneusi* ITS genotypes [15], could have an exclusive dog-to-dog transmission.

Regarding *E. bieneusi* diversity in the other animals included in our study, only one sample could be successfully genotyped from each kind of animal (pigs, rabbits, ostriches and foxes). Genotype I identified in swine has commonly been reported in livestock animals (cattle) [7,9,41] and more recently in humans (symptomatic children) [41], but so far there are no reports of its presence in pigs [9]. Henriques-Gil *et al* [15] showed that genotypes obtained from swine or cattle are significantly segregated, though some of them may appear in these hosts, plus humans and other domestic animals. The new finding reported here corroborates that *E. bieneusi* genotypes found in pigs may be infective to humans.

Genotype D (GenBank accession no. AF023245) was detected both in fox and rabbits. This is the genotype that has the most wide distribution, and has been found in virtually all host species so far analyzed, including humans, domestic and wild animals, such as foxes [7,9,10,14]. This is the first report in rabbits, and should not be surprising as genotype D probably represents one of the most ancient ITS genotypes in *E. bieneusi* [15]. In the case of the ostriches, we identified the type IV genotype in the only sample that was positive for this microsporidia. Like the previous one, this genotype occupies also a central position in the haplotype's network described by Henriques-Gil *et al.* [15], and likewise it has been found in animals and humans, suggesting that these birds can be included in the wide network of potential reciprocal infections of *E. bieneusi*.

CONCLUSIONS

This study shows that microsporidia are present in domestic, farm and wild animals in Spain, corroborating the potential role of them as a source of human infection and probably environmental contamination. However, larger studies are needed to confirm that contact with animals is a high risk for human infection. Our findings demonstrate that *E. bieneusi* genotypes of zoonotic importance are circulating in animals that are in close contact with humans, like dogs and pigs, and therefore could participate in the transmission of this microsporidia in different

regions or areas of Spain. This is confirmed by the presence of the human classical *E. bieneusi* genotype A in dogs. Additionally, since *E. bieneusi* is a cause of significant human diseases in immunocompromised patients (HIV-infected patients and solid-organ transplant recipients), children and elderly people, among others, our results must be considered to establish prophylactic measures that could reduce its transmission.

Figure 1. Geographic distribution of the samples included in the study.
Animal samples from 6 different autonomous communities of Spain were evaluated.

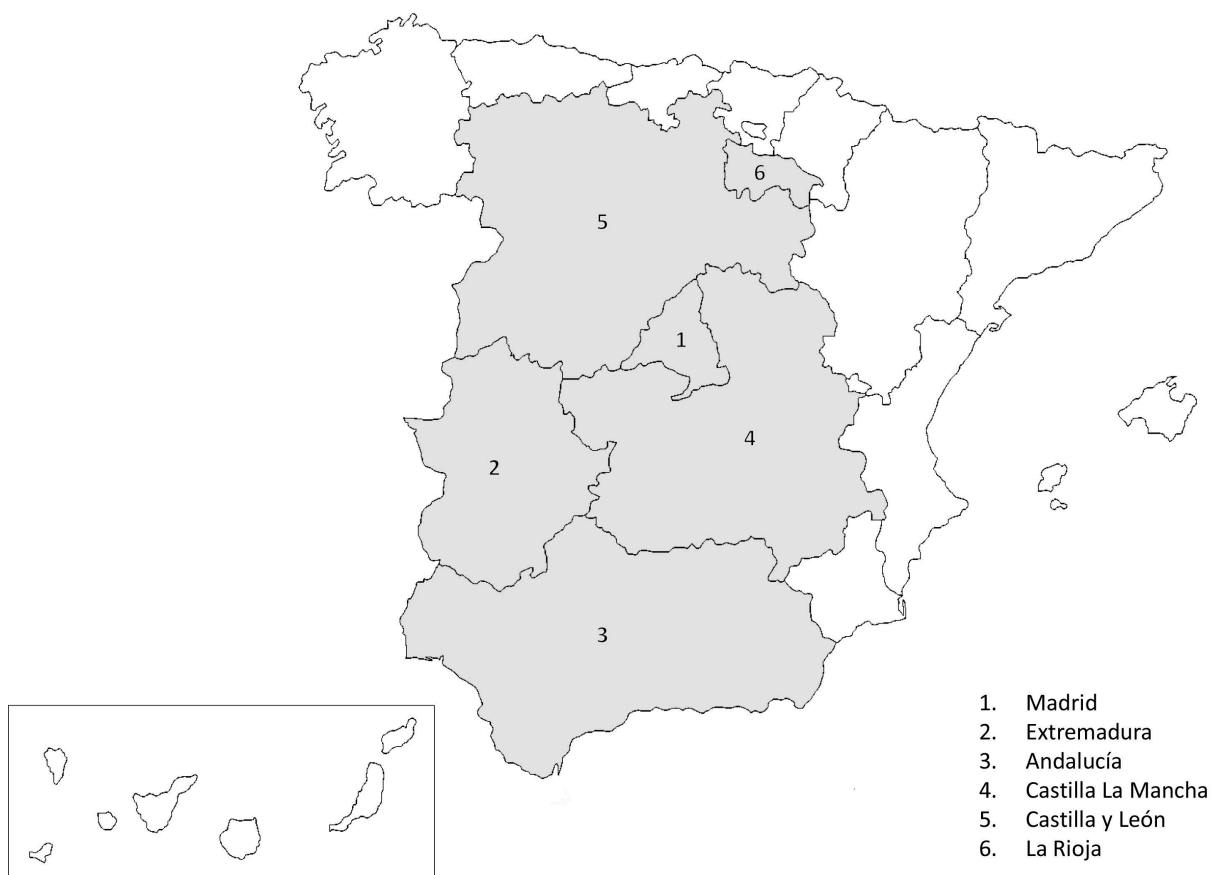


Table 1. Microsporidia species and *E. bieneusi* genotypes in animals from different regions of Spain

| Animal (N) | Autonomous community | Weber stain n (%) | PCR n (%) Microsporidia specie | <i>E. bieneusi</i> genotype (GenBank accession number) | <i>E. bieneusi</i> genotype group ^a |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Dogs (73) | Madrid | 32 (44) | 7 (22) <i>E. bieneusi</i> | A (AF101197) | I |
| Cats (9) | Madrid | 4 (44) | 1 (25) <i>E. intestinalis</i> | - | - |
| Pigs (34) | Extremadura Castilla y León | 27 (79) | 7 (26) <i>E. bieneusi</i> | I ^b (AF135836) | I |
| | | | 2 (7) <i>E. intestinalis</i> | - | - |
| Rabbits (19) | Castilla y León ^c La Rioja ^c Extremadura ^c Madrid | 4 (21) | 4 (100) <i>E. bieneusi</i> | D ^b (AF023245) | I |
| Ostriches (17) | Castilla La Mancha | 14 (82) | 1 (7) <i>E. bieneusi</i> | Type IV (AF267141) | I |
| | | | <i>E. intestinalis</i> 1(7) | - | - |
| Foxes (7) | Andalucía | 4 (57) | <i>E. bieneusi</i> 1 (25) | D (AF023245) | I |

N: total number of samples; n: number of positive samples; %: percentage of positive samples.

^aAccording to Henriques-Gil *et al* [15].

^bOnly one sample was successfully genotyped.

^cSamples from these provinces were collected from rabbit cages with 5 to 7 animals each one.

REFERENCES

1. Didier ES, Stovall ME, Green LC, Brindley PJ, Sestak K, et al. (2004) Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol* 126: 145-166.
2. Izquierdo F, Castro Hermida JA, Fenoy S, Mezo M, Gonzalez-Warleta M, et al. (2011) Detection of microsporidia in drinking water, wastewater and recreational rivers. *Water Res* 45: 4837-4843.
3. Magnet A, Galvan AL, Fenoy S, Izquierdo F, Rueda C, et al. (2012) Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitol Res*: 383-392.
4. Galvan AL, Magnet A, Izquierdo F, Fenoy S, Rueda C, et al. (2013) Molecular characterization of human-pathogenic microsporidia and *Cyclospora cayentanensis* isolated from various water sources in Spain: a year-long longitudinal study. *Appl Environ Microbiol* 79: 449-459.
5. Anane S, Attouchi H (2010) Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol Clin Biol* 34: 450-464.
6. Didier ES, Weiss LM (2006) Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis* 19: 485-492.
7. Matos O, Lobo ML, Xiao L (2012) Epidemiology of *Enterocytozoon bienersi* Infection in Humans. *J Parasitol Res* 2012: 981424.
8. Mathis A, Weber R, Deplazes P (2005) Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 18: 423-445.
9. Santin M, Fayer R (2011) Microsporidiosis: *Enterocytozoon bienersi* in domesticated and wild animals. *Res Vet Sci* 90: 363-371.
10. Li W, Cama V, Feng Y, Gilman RH, Bern C, et al. (2012) Population genetic analysis of *Enterocytozoon bienersi* in humans. *Int J Parasitol* 42: 287-293.
11. Santin M, Fayer R (2009) *Enterocytozoon bienersi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. *J Eukaryot Microbiol* 56: 34-38.

12. Sulaiman IM, Fayer R, Lal AA, Trout JM, Schaefer FW, 3rd, et al. (2003) Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals Harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. *Appl Environ Microbiol* 69: 4495-4501.
13. Sulaiman IM, Fayer R, Yang C, Santin M, Matos O, et al. (2004) Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle indicates that only some isolates have zoonotic potential. *Parasitol Res* 92: 328-334.
14. Thellier M, Breton J (2008) *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 15: 349-358.
15. Henriques-Gil N, Haro M, Izquierdo F, Fenoy S, del Aguila C (2010) Phylogenetic approach to the variability of the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* and its implications for inter- and intrahost transmission. *Appl Environ Microbiol* 76: 3333-3342.
16. del Aguila C, Lopez-Velez R, Fenoy S, Turrientes C, Cobo J, et al. (1997) Identification of *Enterocytozoon bieneusi* spores in respiratory samples from an AIDS patient with a 2-year history of intestinal microsporidiosis. *J Clin Microbiol* 35: 1862-1866.
17. del Aguila C, Moura H, Fenoy S, Navajas R, Lopez-Velez R, et al. (2001) In vitro culture, ultrastructure, antigenic, and molecular characterization of *Encephalitozoon cuniculi* isolated from urine and sputum samples from a Spanish patient with AIDS. *J Clin Microbiol* 39: 1105-1108.
18. del Aguila C, Navajas R, Gurbindo D, Ramos JT, Mellado MJ, et al. (1997) Microsporidiosis in HIV-positive children in Madrid (Spain). *J Eukaryot Microbiol* 44: 84S-85S.
19. Lopez-Velez R, Turrientes MC, Garron C, Montilla P, Navajas R, et al. (1999) Microsporidiosis in travelers with diarrhea from the tropics. *J Travel Med* 6: 223-227.
20. Lores B, Lopez-Miragaya I, Arias C, Fenoy S, Torres J, et al. (2002) Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human

- immunodeficiency virus--negative patients from Vigo, Spain. *Clin Infect Dis* 34: 918-921.
21. Galvan AL, Sanchez AM, Valentin MA, Henriques-Gil N, Izquierdo F, et al. (2011) First cases of microsporidiosis in transplant recipients in Spain and review of the literature. *J Clin Microbiol* 49: 1301-1306.
 22. Andreu-Ballester JC, Garcia-Ballesteros C, Amigo V, Ballester F, Gil-Borras R, et al. (2013) Microsporidia and its relation to Crohn's disease. A retrospective study. *PLoS One* 8: e62107.
 23. Abreu-Acosta N, Lorenzo-Morales J, Leal-Guio Y, Coronado-Alvarez N, Foronda P, et al. (2005) *Enterocytozoon bienersi* (microsporidia) in clinical samples from immunocompetent individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 848-855.
 24. del Aguila C, Izquierdo F, Navajas R, Pieniazek NJ, Miro G, et al. (1999) *Enterocytozoon bienersi* in animals: rabbits and dogs as new hosts. *J Eukaryot Microbiol* 46: 8S-9S.
 25. Lores B, del Aguila C, Arias C (2002) *Enterocytozoon bienersi* (microsporidia) in faecal samples from domestic animals from Galicia, Spain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 941-945.
 26. Haro M, Henriques-Gil N, Fenoy S, Izquierdo F, Alonso F, et al. (2006) Detection and genotyping of *Enterocytozoon bienersi* in pigeons. *J Eukaryot Microbiol* 53 Suppl 1: S58-60.
 27. Haro M, Izquierdo F, Henriques-Gil N, Andres I, Alonso F, et al. (2005) First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Appl Environ Microbiol* 71: 3153-3157.
 28. Dado D, Izquierdo F, Vera O, Montoya A, Mateo M, et al. (2012) Detection of zoonotic intestinal parasites in public parks of Spain. Potential epidemiological role of microsporidia. *Zoonoses Public Health* 59: 23-28.
 29. Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorelkin L, et al. (1992) Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal

- aspirates. The Enteric Opportunistic Infections Working Group. N Engl J Med 326: 161-166.
30. da Silva AJ, Bornay-Llinares FJ, Moura IN, Slemenda SB, Tuttle JL, et al. (1999) Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. Mol Diagn 4: 57-64.
 31. Dowd SE, John D, Eliopolus J, Gerba CP, Naranjo J, et al. (2003) Confirmed detection of Cyclospora cayetanesis, Encephalitozoon intestinalis and Cryptosporidium parvum in water used for drinking. J Water Health 1: 117-123.
 32. da Silva AJ, Schwartz DA, Visvesvara GS, de Moura H, Slemenda SB, et al. (1996) Sensitive PCR diagnosis of Infections by Enterocytozoon bienersi (microsporidia) using primers based on the region coding for small-subunit rRNA. J Clin Microbiol 34: 986-987.
 33. Da Silva AJ, Slemenda SB, Visvesvara GS, Schwartz DA, Wilcox CM, et al. (1997) Detection of Septata intestinalis (Microsporidia) Cali et al. 1993 Using Polymerase Chain Reaction Primers Targeting the Small Submit Subunit Ribosomal RNA Coding Region. Mol Diagn 2: 47-52.
 34. De Groote MA, Visvesvara G, Wilson ML, Pieniazek NJ, Slemenda SB, et al. (1995) Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated Encephalitozoon cuniculi in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. J Infect Dis 171: 1375-1378.
 35. Visvesvara GS, Leitch GJ, da Silva AJ, Croppo GP, Moura H, et al. (1994) Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of a microsporidian, Encephalitozoon hellem, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. J Clin Microbiol 32: 2760-2768.
 36. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser 41: 95-98.
 37. Gray ML, Puette M, Latimer KS (1998) Microsporidiosis in a young ostrich (Struthio camelus). Avian Dis 42: 832-836.

38. Snowden K, Logan K (1999) Molecular identification of *encephalitozoon hellem* in an ostrich. *Avian Dis* 43: 779-782.
39. Kasickova D, Sak B, Kvac M, Ditrich O (2009) Sources of potentially infectious human microsporidia: molecular characterisation of microsporidia isolates from exotic birds in the Czech Republic, prevalence study and importance of birds in epidemiology of the human microsporidial infections. *Vet Parasitol* 165: 125-130.
40. Santin M, Cortes Vecino JA, Fayer R (2008) *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in dogs in Bogota, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 79: 215-217.
41. Zhang X, Wang Z, Su Y, Liang X, Sun X, et al. (2011) Identification and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in China. *J Clin Microbiol* 49: 2006-2008.

3.4 Estudio 4: First Cases of Microsporidiosis in Transplant Recipients in Spain and Review of the Literature

A. L. Galván,^{1,2} A. M. Martín Sánchez,³ M. A. Pérez Valentín,⁴ N. Henriques-Gil,⁵ F. Izquierdo,¹ S. Fenoy,¹ and C. del Aguila^{1*}

Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, 28668 Boadilla del Monte, Madrid, Spain¹; Escuela de Microbiología, Grupo GIEPI, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia²; and Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Servicio de Microbiología,³Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Servicio de Nefrología,⁴ and Laboratorio de Genética, Facultad de Farmacia,⁵ Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, 28668 Boadilla del Monte, Madrid, Spain.

Publicado en: Journal of Clinical Microbiology 2011; 49 (4): 1301-1306.

Resumen

Los pacientes trasplantados y sometidos a terapia inmunosupresora se consideran un grupo de alto riesgo para la infección por los microsporidios. En este estudio se realizó la identificación y caracterización molecular de microsporidios en dos pacientes trasplantados procedentes de las Islas Canarias (España) y que presentaban sintomatología intestinal. Mediante tinción de tricrómico modificado se detectó la presencia de esporas de microsporidios y por PCR se identificó a *E. bienewsi* en las heces de ambos pacientes. El análisis de la secuencia de la región ITS del ADN de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSU-RNA) reveló la presencia del genotipo D en los dos aislados. Este genotipo tiene un amplio rango de hospedadores y se ha encontrado en todos los continentes, lo que facilita su transmisión. Con este estudio se confirma que los pacientes trasplantados son una población susceptible para adquirir la microsporidiosis, y que estos parásitos se deben tener en cuenta en los casos de diarrea persistente y en el diagnóstico diferencial de otros síndromes.

First Cases of Microsporidiosis in Transplant Recipients in Spain and Review of the Literature[▽]

A. L. Galván,^{1,2} A. M. Martín Sánchez,³ M. A. Pérez Valentín,⁴ N. Henriques-Gil,⁵
F. Izquierdo,¹ S. Fenoy,¹ and C. del Aguila^{1*}

Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU, Urbanización Montepríncipe, 28668 Boadilla del Monte, Madrid, Spain¹; Escuela de Microbiología, Grupo GIEPI, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia²; and Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Servicio de Microbiología,³ Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Servicio de Nefrología,⁴ and Laboratorio de Genética, Facultad de Farmacia,⁵ Universidad San Pablo-CEU, Urbanización Montepríncipe, 28668 Boadilla del Monte, Madrid, Spain

Received 9 September 2010/Returned for modification 30 November 2010/Accepted 9 February 2011

Microsporidia are currently considered emerging pathogens responsible for life-threatening infections in organ transplant recipients. Here, we describe the first cases of intestinal microsporidiosis by *Enterocytozoon bieneusi* genotype D in two non-HIV-infected renal transplant recipients from Spain. Previously reported cases of microsporidiosis in organ transplant recipients have also been reviewed, highlighting the necessity of considering organ transplant recipients a risk group for microsporidiosis. A systematic search for these parasites is recommended in cases of persistent diarrhea and in the differential diagnosis of other syndromes, such as chronic fever of unknown etiology.

Microsporidia are ubiquitous, obligate intracellular opportunistic parasites, recently related to fungi, capable of infecting a wide range of vertebrate and invertebrate hosts (2, 12). Within microsporidia, 8 genera and 14 species have been associated with human infections, among which *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* are the most commonly reported (12). These opportunistic pathogens cause a variety of systemic and nonsystemic diseases, with chronic diarrhea as the most common clinical manifestation, although the spectrum of diseases caused by them is broad and includes eye, respiratory, renal, and central nervous system infections (12).

Most microsporidial infections have been reported to occur in severely immunocompromised individuals, mainly HIV/AIDS patients, but cases in HIV-negative people, including travelers and elderly people, are constantly increasing (11, 27). Additionally, the number of non-HIV-infected patients with other forms of immunosuppression is also increasing. Among these, organ transplant recipients (OTR) have recently been considered a group of patients at risk for these pathogens (22). To date, only 21 cases of microsporidiosis in solid organ transplant (SOT) and bone marrow transplant (BMT) recipients who were HIV negative have been described (4, 13–17, 19, 20, 22, 23, 28–31, 34, 40, 44, 49). In these patients, diarrhea is the most frequent clinical manifestation and *E. bieneusi* the species mainly involved (Table 1). Moreover, there are three retrospective studies in which microsporidia have been reported to occur in transplant patients (25, 35, 46). Liguory and collaborators studied microsporidial infection in stool specimens from 100 patients obtained over a 6-year period (1994 to 2000), and

they found 8 organ transplant recipients (6 renal, 1 liver, and 1 heart-lung) who were positive for *E. bieneusi* (25). Rabodonirina and collaborators, in a retrospective study carried out in France, found 23 cases of microsporidiosis in transplant patients, including 3 who had already been described in the literature between 1993 and 2001 (35). Recently, ten Hove and collaborators performed a retrospective phylogenetic analysis on isolates of *E. bieneusi* collected between 2003 and 2004, and they included five kidney transplant recipients that were positive for this microsporidian (46, 47).

We describe the first findings of intestinal infection caused by *E. bieneusi* in two renal transplant recipients from Gran Canaria, Spain, and we review the published cases of microsporidiosis in SOT and BMT recipients.

Case Reports

Patient 1. A 66-year-old male who received a renal transplant in April 2009 was admitted to the nephrology unit of the Hospital Universitario Insular de Gran Canaria (Spain) for severe leucopenia (1,000 cells/mm³) and abundant liquid diarrhea in July of the same year. He had a history of chronic renal failure secondary to a nephroangiosclerosis, arterial hypertension, and a heart attack. Immunosuppressive therapy consisted of steroids, tacrolimus, and mycophenolate mofetil (MMF). This treatment, as well as valganciclovir and septrim, was suspended after admittance to the hospital, due to the suspicion of pharmacologic toxicity. No bacterial or viral pathogens were found in the stool samples. The colonoscopy was normal. Cytomegalovirus (CMV) antigen in colonic mucosa was positive. Calcofluor white (48) and modified trichrome (53) stains showed structures evocative of microsporidial spores in stool samples (Fig. 1). The patient was treated with three doses of filgrastim, fluid therapy, and diet control. The clinical symptoms

* Corresponding author. Mailing address: Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU, Urbanización Montepríncipe, 28668 Boadilla del Monte, Madrid, Spain. Phone: 34 91 3724721. Fax: 34 91 3510475. E-mail: cagupue@ceu.es.

[▽] Published ahead of print on 16 February 2011.

TABLE 1. Microsporidiosis in transplant recipients^a

| Case (reference[s]) | Type of transplant (no. of patients) | Age (yr) | Gender (no. of patients) | Species/genotype (no. of patients) | Immunosuppressive treatment agent(s) | Clinical manifestation(s) | Laboratory diagnosis method(s) | Treatment/outcome | Country/ Publication yr |
|---------------------|-----------------------------------------------|----------|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1 ^b (25) | Kidney (6); liver (1); heart-lung (1) | | | <i>E. bienersi</i> /C (7) and D (1) | NA | Diarrhea | MTS, PCR, PCR-RFLP | NA | France/2001 |
| 2 ^b (35) | Kidney (14); liver (5); heart and/or lung (4) | | F (7); M (16) | NA | ATG, CS, AZ, MMF, tacrolimus | Asymptomatic, diarrhea, wt loss | PCR, TEM | Albendazole, fumagillin | France/2003 |
| 3 ^b (46) | Kidney (5) | | F (2); M (3) | <i>E. bienersi</i> /C | NA | NA | PCR | NA | Netherlands/2009 |
| 4 (40) | Liver | 48 | F | Undetermined | Tacrolimus, prednisone | Intestinal | MTS | Metronidazole/recovery | U.S./1995 |
| 5 (34) | Heart; lung | 48 | M | <i>E. bienersi</i> | CS, AZ, methylprednisone | Intestinal | MTS, TEM | Metronidazole/recovery | France/1996 |
| 6 (20) | Bone marrow | 27 | F | Undetermined | L-Asparaginase, vincristine, daunomycin, prednisone, CS | Intestinal, respiratory | TEM | | India/1997 |
| 7 (16) | Kidney | 46 | M | <i>E. bienersi</i> | AZ, CS, prednisone, MMF | Intestinal | MTS, PCR | Albendazole/recovery | France/1999 |
| 8 (16) | Kidney | 24 | M | <i>E. bienersi</i> | Thymoglobulin, prednisone, CS, AZ, MMF | Intestinal | MTS, PCR | | France/1999 |
| 9 (17) | Heart | 48 | M | <i>E. bienersi</i> | CS, AZ, methylprednisone | Intestinal | MTS | Albendazole, metronidazole/recovery | U.S./1999 |
| 10 (29) | Kidney | 38 | F | <i>E. bienersi</i> | Tacrolimus, prednisone, MMF | Intestinal | MTS, PCR | Albendazole/recovery | France/2000 |
| 11 (41) | Liver | 36 | F | <i>E. bienersi</i> /C | Tacrolimus | Intestinal | MTS, PCR | Albendazole/ <i>E. bienersi</i> persistence | Germany/2001 |
| 12 (15) | Liver | 36 | F | <i>E. bienersi</i> | Tacrolimus | Intestinal | MTS, PCR-RFLP | Albendazole/symptomatic improvement, <i>E. bienersi</i> persistence | Germany/2001 |
| 13 (23) | Kidney | 39 | M | <i>Encephalitozoon</i> sp. | AZ, CS, Prednisone | Fever, renal impairment | GCS, TEM | Albendazole/recovery | South Africa/2001 |
| 14 (30) | Kidney | 43 | F | <i>E. canaliculi</i> type III strain | Methylprednisone | Disseminated | GCS, IFAT, TEM, PCR | Albendazole, topical fumagillin (keratitis)/ death related to neurological involvement | Canada/2002 |
| 15 (31) | Liver | NA | | <i>E. bienersi</i> | Tacrolimus | NA | MTS, PCR | Fumagillin/recovery | France/2002 |
| 16 (31) | Kidney | NA | | <i>E. bienersi</i> | Tacrolimus, prednisone | NA | MTS, PCR | Fumagillin/recovery | France/2002 |
| 17 (14) | Kidney | 42 | M | <i>E. canaliculi</i> | Rapamycin, CS, prednisone | Disseminated | IFAT, TEM | Albendazole, fumagillin/ relapse 1 year later | Mexico/2003 |
| 18 (28) | Kidney | 45 | F | <i>E. canaliculi</i> | Steroids | Disseminated | PCR, TEM | Antimicrobial therapy/ death | U.S./2003 |
| 19 (33, 45) | Bone marrow | 21 | F | <i>E. canaliculi</i> type III strain | Thiotepa, CYP, ATG, CS | Pulmonary | MTS, TEM, PCR | NA | U.S./2004-2005 |
| 20 (4) | Pancreas; kidney | 43 | M | <i>Encephalitozoon</i> sp. | Tacrolimus, MMF, prednisone, AZ | Disseminated | TEM | Postmortem diagnosis | U.S./2004 |
| 21 (19) | Cornea | 60 | M | Undetermined | Prednisolone acetate | Keratoconjunctivitis | CW, GS, PCR | Topical ciprofloxacin | India/2006 |
| 22 (22) | Kidney | 64 | M | <i>E. bienersi</i> | Tacrolimus, MMF | Intestinal | Uvitex-2B, PCR | | France/2009 |
| 23 (22) | Liver | 45 | M | <i>E. bienersi</i> | CS, everolimus | Intestinal | HE, Uvitex-2B, PCR | | France/2009 |
| 24 (44) | Kidney | 38 | F | <i>E. canaliculi</i> type IV strain | Thymoglobulin, MMF, CsA | Disseminated | Uvitex-2B, PCR | Albendazole/recovery | France/2010 |
| Current report | Kidney | 66 | M | <i>E. bienersi</i> /D | Steroids, tacrolimus, MMF | Intestinal | MTS, PCR | Filgrastim/recovery | Spain |
| Current report | Kidney | 54 | M | <i>E. bienersi</i> /D | Tacrolimus, MMF | Intestinal | MTS, PCR | Albendazole, metronidazole/recovery | Spain |

^a F, female; M, male; CS, cyclosporine; AZ, azathioprine; MMF, mycophenolate mofetil; CsA, cyclosporine A; Cyp, cyclophosphamide; ATG, antilymphocyte globulin; MTS, modified trichrome stain; RFLP, restriction fragment length polymorphism; GCS, Gram chromotrope stain; HE, hematoxylin-eosin stain; TEM, transmission electron microscopy; IFAT, indirect immunofluorescence assay; PCR, polymerase chain reaction; CW, calcofluor white; GS, Gram stain; NA, not available; ND, not determined.

^b Retrospective study.

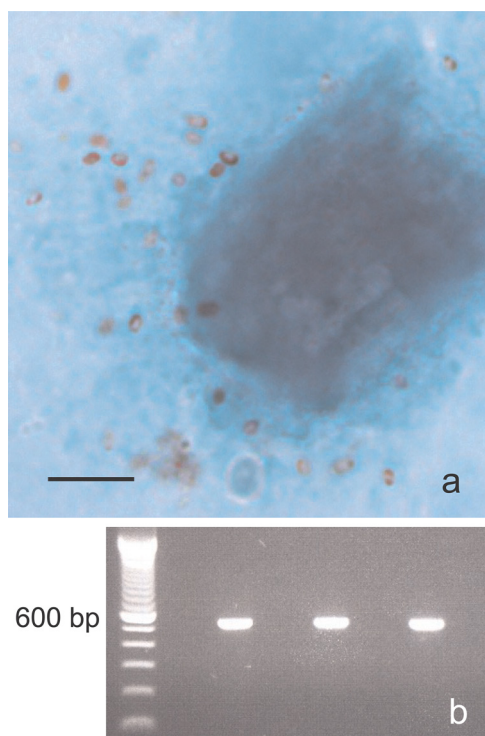


FIG. 1. (a) Microsporidial spores stained with a modified trichrome stain from patient 1. Bar, 5 μ m. (b) PCR amplification of the rDNA coding region containing the 243 bp of the ITS of *E. bienersi*. First lane, molecular marker (100-bp ladder); third lane, patient 1; fifth lane, patient 2; seventh lane, positive control; eighth lane, negative control.

disappeared, and the patient was discharged afebrile, with a normal white blood cell count and normal bowel movements.

Patient 2. A 54-year-old man with a history of kidney transplant in 1994 was admitted to the nephrology unit of the Hospital Universitario Insular de Gran Canaria for persistent liquid diarrhea on 9 June 2009. His immunosuppression regimen consisted of tacrolimus and MMF. The patient did not improve after MMF suspension and dietary treatment. Laboratory tests showed a slight deterioration of renal function. Cytomegalovirus antigen was negative. *Clostridium difficile* toxin was detected in fecal samples. Fecal smears showed microsporidial spores stained by calcofluor white (48) and modified trichrome (53) stains. The clinical symptoms disappeared after initiation of fluid therapy, diet control, and metronidazole treatment. Normal bowel habits and renal function were recovered. Two weeks later, the patient showed episodes of diarrhea with epigastric pain, microsporidial spores were observed in stool samples, and results for *C. difficile* toxin, virus, bacteria, and parasites were negative. Treated with albendazole, he became asymptomatic but continued seeding a smaller amount of microsporidial spores, detected only by PCR.

MATERIALS AND METHODS

Staining methods. Thin smears from one diarrheic stool sample from patient 1 and three samples from patient 2 were prepared and stained, using calcofluor white stain (48) and Weber's chromotrope-based stain (53).

DNA extraction and purification. DNA from unpreserved stools was extracted by following the methods described earlier (5). DNA from fecal samples was

extracted by bead disruption of spores using a fast-DNA-spin kit, according to the manufacturer's instructions (Bio 101, Carlsbad, CA). PCR inhibitors were removed using a QIAquick PCR kit (Qiagen, Chatsworth, CA).

PCR amplification. Microsporidial small-subunit-rRNA (SSU-rRNA) coding regions were amplified using the following species-specific primers: EBIEF1/EBIER1 for *E. bienersi* (5), SINTF/SINTR for *E. intestinalis* (6), EHELF/EHELRL for *Encephalitozoon hellem* (50), and ECUNF/ECUNR for *Encephalitozoon cuniculi* (7). The PCR amplification was done with a GenAmp kit (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) according to the manufacturer's procedures and the conditions for the reaction described previously (8). Purified samples were tested for the presence of PCR inhibitors, as described previously (8). Amplification products were analyzed, electrophoresis was performed with 2% agarose gel, and the samples were visualized by ethidium bromide staining (8).

DNA sequencing analysis. Genotyping of *E. bienersi* was performed by sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA (rDNA). For this purpose, primers that amplified a fragment of 536 bp containing the 243 bp of the ITS were designed (primer F, 5'-CTTCGGCTCTG AATATCTAT3', and primer R, 5'-GCCACTACTAACGGAATCCTA3'). PCR amplifications were performed with the following cycling conditions: denaturing at 94°C for 30 s, alignment at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 90 s. Each PCR product was sequenced in both directions using a BigDye Terminator sequencing kit with an ABI PrismR 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems). The resulting sequences were analyzed by the Bioedit program and compared with reference sequences from GenBank.

RESULTS

Staining methods. The two patients studied showed structures evocative of microsporidial spores in the sample analyzed from patient 1 and in two samples from patient 2, obtained before albendazole treatment when analyzed by calcofluor white staining (48) and Weber's chromotrope-based staining (53). Spores in the chromotrope-stained smears appeared pinkish red and measured 0.9 to 1.2 μ m in length. Many spores exhibited the characteristic posterior vacuole and beltlike stripe in the middle (Fig. 1a). However, in the second stool sample from patient 2, analyzed 2.5 months later, and after albendazole treatment, no microsporidial spores were observed by the staining methods.

PCR. PCR was performed with unfixed stools from the two patients. Amplification of DNA isolated with specific primers for the most common microsporidia infecting humans showed positive results with *E. bienersi*-specific primers (5) in both cases for all samples. However, *E. intestinalis*-specific PCR (6), *E. hellem*-specific PCR (50), and *E. cuniculi*-specific PCR (7) were negative (Fig. 1b) for the two patients studied.

Genotyping. Genotyping of the *E. bienersi* isolates was performed by sequence analysis of the ITS region of rDNA. The sequence analysis of PCR amplified products showed 100% homology with genotype D in both cases (GenBank accession number AF101200.1) (38).

DISCUSSION

Enterocytozoon bienersi is the most common microsporidian associated with human disease, particularly in severely immunosuppressed individuals with CD4⁺ counts of <100/mm³ (12). In the presence of HIV infection, it is associated with diarrhea and wasting syndrome, and cellular immunoresponse has been considered essential for the control and elimination of this microsporidian (12). In SOT and BMT recipients, an immunosuppressive therapy is always prescribed, leading to a profound cellular immunodeficiency (22). However, few cases of microsporidiosis have been reported to occur in transplant

patients (Table 1). Chronic diarrhea is the main clinical manifestation in most infections and *E. bienewsi* the most common species encountered in more than half of the cases in OTR, followed by *E. cuniculi* (Table 1) (22, 35). This agrees with the observations for the two patients in our study, with persistent diarrhea with *E. bienewsi* detected in stool samples by PCR and a modified trichrome stain. However, microsporidiosis occurred in reported cases from 19 days up to 7 years after transplantation (22). In patient 1 in our study, it appeared 3 months later, but in patient 2, it appeared 15 years after transplantation.

In both patients, we detected other microorganisms that have been associated with gastrointestinal symptoms in transplant recipients, including diarrhea. Patient 1 was positive for CMV antigen in colonic mucosa, which is a common finding, since CMV infection is one of the major infectious complications in transplant recipients with nonsystemic symptoms that include fever, diarrhea, myalgias, malaise, and, in severe cases, hepatitis, pneumonia, and colitis (18). However, the gastrointestinal tract is one of the least common sites of CMV disease. Taking into account that this patient showed no other symptoms besides diarrhea and received prophylaxis with an antiviral, we believe that *E. bienewsi* would play an important role in the diarrhea observed. It should be noted that in one of the renal transplant recipients reviewed, the authors suggest that CMV infection may further enhance the susceptibility to microsporidial infection (30). Patient 2 showed a test positive for *Clostridium difficile*, which is a significant pathogen leading to diarrhea and colitis in transplant recipients (32). However, the majority of *C. difficile* infections concern patients in the early posttransplant period, with a prior long-lasting treatment with antibiotics, which was not the case for patient 2. Nevertheless, the patient was treated with metronidazole, a first-line therapy for *C. difficile* (21), and the results for the *C. difficile* test were negative from then on.

The patients' outcomes were as follows. Patient 1 showed a clinical course similar to that described in previously reported cases for SOT recipients (31), in which suspension of the immunosuppressive treatment led to recovery. Therefore, we suggest that restored immune balance after MMF withdrawal and filgrastim treatment allowed the recovery of the patient. Patient 2 was capable of resolving the symptoms only after a sequential therapy with metronidazole and albendazole: metronidazole treatment initially allowed the elimination of *C. difficile*, and afterwards, albendazole treatment allowed a patient decrease in microsporidial spore seeding and the resolution of diarrheal symptoms. To date, no curative therapy for *E. bienewsi* infection exists. Metronidazole, which is indicated for *C. difficile* treatment (21), has occasionally been reported to cause transient improvement of the symptoms of microsporidiosis (17, 41, 54). However, albendazole, which is effective against microsporidia other than *E. bienewsi*, seems to alleviate diarrhea in *E. bienewsi*-infected patients without clearing the infection, but with a notable decrease in spore seeding (8, 41, 51, 52).

Both patients received immunosuppressive therapy with tacrolimus and MMF at the time of diagnosis. Other immunosuppressive therapies described for OTR diagnosed with microsporidiosis included cyclosporine, prednisone, azathioprine, rapamycin, antilymphocyte globulin, or methotrexate (22, 35).

It has been suggested that the lack of gamma interferon (IFN- γ) resulting from the Th cell depletion induced by MMF may be responsible, at least in part, for the onset of microsporidiosis (16) and the triggering of the intestinal symptomatology by the parasite. Since patient 1 recovered from symptoms after treatment suspension, it is very likely that this recovery was associated with the immune reconstitution balance. The same situation was described in previously published reports of microsporidiosis in renal transplant recipients (16). For patient 2, discontinuation of the immunosuppressive therapy helped by metronidazole and albendazole treatment improved the patient's health conditions, including normal bowel movements. The same outcome has been described to occur in two of the four OTR with *E. bienewsi* infection who were treated with albendazole (34, 41). However, in the other two cases, a complete clearance of spores was achieved (16, 29), suggesting that the discontinuation of the immunosuppressive therapy was probably what mainly improved the patients' health conditions (16, 29, 41).

In reference to the presence of microsporidia in Spain, they have mainly been reported to occur in HIV/AIDS patients (8–10) but also in HIV-negative individuals, including travelers (26), elderly people (27), and the immunocompetent population (1). In most of these studies, *E. bienewsi* was the microsporidian responsible for clinical symptoms. However, to date, no cases of microsporidiosis in OTR have been described. This report recognizes the implication of microsporidia in OTR pathology for the first time in Spain.

In most cases, microsporidia detected in OTR were characterized only to the species level (22, 35). *Encephalitozoon cuniculi* is the best-characterized microsporidian in OTR isolates at the genotype level (30, 33, 44). In three of five *E. cuniculi* infections described to occur in SOT and BMT recipients, the genotype was investigated; two of these infections showed ITS-related genotype III, known as the "dog strain" (30), and for the third infection, a new genotype, genotype IV, was recently described (44). In reference to the genetic variation among isolates of *E. bienewsi* (18, 47), analyses of ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences have identified more than 70 genotypes of *E. bienewsi* (18, 47). Some of these genotypes have been recognized as host specific, while others have been found to infect humans and animals, supporting the likelihood of zoonotic transmission (18, 47). In our 2 patients, genotype D was identified. This genotype belongs to group 1, which includes numerous genotypes from various origins: humans, both HIV-positive and negative, but also domestic and wild animals. Genotype D is widespread in nature (47). This genotype was first found in humans in Germany and afterwards in other countries of America, Asia, and Africa. It was also found in numerous diverse animals (swine, cattle, macaque, muskrat, raccoon, beaver, fox, dog, and falcon) (47). The type D genotype was commonly reported to occur in HIV-positive patients in Thailand (24) and Peru (42) and in two isolated cases in Europe (36, 37), and it was recently isolated from 3 HIV-negative individuals in Cameroon (3), which confirms the wide spread of this genotype. Genotype D represents 15% of isolates from four species of wildlife animals in North America (43) and 26% of isolates found in cats in Colombia (39), supporting a zoonotic route of transmission for this strain.

Information about molecular epidemiological data for *E. bienersi* isolates from transplant recipients is limited. Several studies have described the predominance of genotype C in this population (25, 41, 46). Liguory and collaborators (25) genotyped 100 *E. bienersi* isolates from both HIV- and non-HIV-infected patients, including eight transplant recipients. In the transplant patients, they found genotype II (genotype C) in seven of these patients and genotype IV (genotype D) in one (25). They also described that the distribution of genotypes was significantly different among HIV-infected patients compared to that among non-HIV-infected patients, and they suggested differences in the epidemiology of the infection according to HIV infection status or differences in the virulence of the microsporidian strain (25).

Sing and collaborators also found human genotype C in a liver transplant recipient, based on analysis of the ribosomal DNA (rDNA) internal transcribed spacer (ITS) sequence (41). ten Hove and colleagues performed a molecular characterization of *E. bienersi* isolates from immunosuppressed and immunocompetent patient groups in Malawi and the Netherlands (46). They identified 16 genotypes, 9 of which had not previously been described. Genotypes B, K, and D were most prevalent among HIV patients, whereas genotype C was identified in five isolates from kidney transplant recipients and was not seen in any of the other groups of patients (46).

In contrast to the microsporidiosis caused by *E. bienersi*, which is generally confined to the digestive tract, as shown in reported cases (15–17, 29, 31, 34) and in the 2 cases described here, *Encephalitozoon* infections were frequently disseminated in OTR (4, 14, 30, 44, 45). In these cases, microsporidia were most frequently identified in urine samples but were also isolated from various tissues or body fluids, including those from stools, sputum, conjunctival scraping, brain, and kidney biopsy specimens. The most commonly reported clinical symptoms in disseminated microsporidiosis in OTR were keratoconjunctivitis, fever, abdominal pain, and respiratory symptoms (cough and thoracic pain) (44). Diagnosis of microsporidiosis in these patients was conducted mainly by trichrome staining and PCR. Most of the cases were described to occur in Europe, but there were also seven in America, two in India, and one in Africa. The antiparasitic treatment used included albendazole, metronidazole, and fumagillin, independent of the microsporidian species found. In most cases of infection by *E. bienersi*, the recovery was related to immune reconstitution and/or immunosuppressive therapy suspension (22).

In conclusion, transplant recipients undergoing immunosuppressive therapy should be considered a risk group for acquisition of microsporidiosis. Therefore, in all countries (including those in which microsporidia have not yet been recognized), microsporidia should be considered in cases of persistent diarrhea and also in the differential diagnosis of other syndromes, such as chronic fever of unknown etiology, after more-common causes of diarrheal disease are ruled out. The search should be performed not only in stool samples but also, at least, in urine samples. A molecular characterization of the parasite isolates should be considered to convey information about the frequency and distribution of microsporidian species and genotypes in this group of patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sergio Llorens for his excellent technical support. We are indebted to Anne Deane for helpful revision of the manuscript.

This work was supported by a grant from Fundación San Pablo-CEU (USP-PC03/08) and by grant PI061593 from Instituto de Salud Carlos III (FISS). Ana Luz Galvan was supported in Spain by an overseas fellowship from Colciencias (Antioquia University, Colombia).

There is no conflict of interest in this study.

REFERENCES

1. Abreu-Acosta, N., et al. 2005. Enterocytozoon bienersi (microsporidia) in clinical samples from immunocompetent individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **99**:848–855.
2. Adl, S. M., et al. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**:399–451.
3. Breton, J., et al. 2007. New highly divergent rRNA sequence among biologically diverse genotypes of Enterocytozoon bienersi strains isolated from humans in Gabon and Cameroon. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2580–2589.
4. Carlson, J. R., et al. 2004. Disseminated microsporidiosis in a pancreas/kidney transplant recipient. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **128**:e41–e43.
5. da Silva, A. J., et al. 1996. Sensitive PCR diagnosis of Infections by Enterocytozoon bienersi (microsporidia) using primers based on the region coding for small-subunit rRNA. *J. Clin. Microbiol.* **34**:986–987.
6. da Silva, A. J., et al. 1997. Detection of Septata intestinalis (microsporidia) Cali et al. 1993 using polymerase chain reaction primers targeting the small subunit ribosomal RNA coding region. *Mol. Diagn.* **2**:47–52.
7. De Groote, M. A., et al. 1995. Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated Encephalitozoon cuniculi in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. *J. Infect. Dis.* **171**:1375–1378.
8. del Aguila, C., et al. 1997. Identification of Enterocytozoon bienersi spores in respiratory samples from an AIDS patient with a 2-year history of intestinal microsporidiosis. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1862–1866.
9. del Aguila, C., et al. 2001. In vitro culture, ultrastructure, antigenic, and molecular characterization of Encephalitozoon cuniculi isolated from urine and sputum samples from a Spanish patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1105–1108.
10. del Aguila, C., et al. 1997. Microsporidiosis in HIV-positive children in Madrid (Spain). *J. Eukaryot. Microbiol.* **44**:845–855.
11. Didier, E. S., et al. 2004. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet. Parasitol.* **126**:145–166.
12. Didier, E. S., and L. M. Weiss. 2006. Microsporidiosis: current status. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**:485–492.
13. Fogla, R., P. Padmanabhan, K. L. Therese, J. Biswas, and H. N. Madhavan. 2005. Chronic microsporidian stromal keratitis in an immunocompetent, non-contact lens wearer. *Indian J. Ophthalmol.* **53**:123–125.
14. Gamboa-Dominguez, A., et al. 2003. Disseminated encephalitozoon cuniculi infection in a Mexican kidney transplant recipient. *Transplantation* **75**:1898–1900.
15. Goetz, M., S. Eichenlaub, G. R. Pape, and R. M. Hoffmann. 2001. Chronic diarrhea as a result of intestinal microsporidiosis in a liver transplant recipient. *Transplantation* **71**:334–337.
16. Guerard, A., et al. 1999. Intestinal microsporidiosis occurring in two renal transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Transplantation* **68**:699–707.
17. Gumbo, T., R. E. Hobbs, C. Carlyn, G. Hall, and C. M. Isada. 1999. Microsporidia infection in transplant patients. *Transplantation* **67**:482–484.
18. Henriques-Gil, N., M. Haro, F. Izquierdo, S. Fenoy, and C. del Aguila. 2010. Phylogenetic approach to the variability of the microsporidian Enterocytozoon bienersi and its implications for inter- and intrahost transmission. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:3333–3342.
19. Kakrania, R., J. Joseph, P. K. Vaddavalli, N. Gangopadhyay, and S. Sharma. 2006. Microsporidia keratoconjunctivitis in a corneal graft. *Eye (Lond.)* **20**:1314–1315.
20. Kelkar, R., et al. 1997. Pulmonary microsporidian infection in a patient with CML undergoing allogeneic marrow transplant. *Bone Marrow Transplant.* **19**:179–182.
21. Kuty, P. K., et al. Risk factors for and estimated incidence of community-associated *Clostridium difficile* infection, North Carolina, U. S. A. *Emerg. Infect. Dis.* **16**:197–204.
22. Lantermier, F., et al. 2009. Microsporidiosis in solid organ transplant recipients: two Enterocytozoon bienersi cases and review. *Transpl. Infect. Dis.* **11**:83–88.
23. Latib, M. A., M. D. Pascoe, M. S. Duffield, and D. Kahn. 2001. Microsporidiosis in the graft of a renal transplant recipient. *Transpl. Int.* **14**:274–277.
24. Leelayoova, S., et al. 2006. Identification of genotypes of Enterocytozoon bienersi from stool samples from human immunodeficiency virus-infected patients in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3001–3004.
25. Liguory, O., C. Sarfati, F. Derouin, and J. M. Molina. 2001. Evidence of different Enterocytozoon bienersi genotypes in patients with and without human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2672–2674.

26. Lopez-Velez, R., et al. 1999. Microsporidiosis in travelers with diarrhea from the tropics. *J. Travel Med.* **6**:223–227.
27. Lores, B., et al. 2002. Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienersi* in elderly human immunodeficiency virus-negative patients from Vigo, Spain. *Clin. Infect. Dis.* **34**:918–921.
28. Mahmood, M. N., M. E. Keohane, and E. M. Burd. 2003. Pathologic quiz case: a 45-year-old renal transplant recipient with persistent fever. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **127**:e224–e226.
29. Metge, S., et al. 2000. A case of *Enterocytozoon bienersi* infection in an HIV-negative renal transplant recipient. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:221–223.
30. Mohindra, A. R., et al. 2002. Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient. *Transpl. Infect. Dis.* **4**:102–107.
31. Molina, J. M., et al. 2002. Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. *N. Engl. J. Med.* **346**:1963–1969.
32. Niemczyk, M., et al. 2005. Infections caused by *Clostridium difficile* in kidney or liver graft recipients. *Ann. Transplant.* **10**:70–74.
33. Orenstein, J. M., et al. 2005. Fatal pulmonary microsporidiosis due to *encephalitozoon cuniculi* following allogeneic bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia. *Ultrastruct. Pathol.* **29**:269–276.
34. Rabodonirina, M., et al. 1996. *Enterocytozoon bienersi* as a cause of chronic diarrhea in a heart-lung transplant recipient who was seronegative for human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* **23**:114–117.
35. Rabodonirina, M., L. Cotte, S. Radenne, E. Besada, and C. Trepo. 2003. Microsporidiosis and transplantation: a retrospective study of 23 cases. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50**(Suppl.):583.
36. Rinder, H., S. Katzwinkel-Wladarsch, A. Thomschke, and T. Loscher. 1998. Strain differentiation in microsporidia. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **23**:433–437.
37. Sadler, F., et al. 2002. Genotyping of *Enterocytozoon bienersi* in AIDS patients from the north west of England. *J. Infect.* **44**:39–42.
38. Santin, M., and R. Fayer. 2009. *Enterocytozoon bienersi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. *J. Eukaryot. Microbiol.* **56**:34–38.
39. Santin, M., J. M. Trout, J. A. Vecino, J. P. Dubey, and R. Fayer. 2006. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienersi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. *Vet. Parasitol.* **141**:334–339.
40. Sax, P. E., J. D. Rich, W. S. Pieciak, and Y. M. Trnka. 1995. Intestinal microsporidiosis occurring in a liver transplant recipient. *Transplantation* **60**:617–618.
41. Sing, A., K. Tybus, J. Heesemann, and A. Mathis. 2001. Molecular diagnosis of an *Enterocytozoon bienersi* human genotype C infection in a moderately immunosuppressed human immunodeficiency virus-seronegative liver-transplant recipient with severe chronic diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2371–2372.
42. Sulaiman, I. M., et al. 2003. A molecular biologic study of *Enterocytozoon bienersi* in HIV-infected patients in Lima, Peru. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50**(Suppl.):591–596.
43. Sulaiman, I. M., et al. 2003. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals Harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bienersi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4495–4501.
44. Talabani, H., et al. 2010. Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* **48**:2651–2653.
45. Teachey, D. T., et al. 2004. Pulmonary infection with microsporidia after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **33**:299–302.
46. ten Hove, R. J., et al. 2009. Characterization of genotypes of *Enterocytozoon bienersi* in immunosuppressed and immunocompetent patient groups. *J. Eukaryot. Microbiol.* **56**:388–393.
47. Thellier, M., and J. Breton. 2008. *Enterocytozoon bienersi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* **15**:349–358.
48. van Gool, T., et al. 1993. Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by a new rapid fluorescence technique. *J. Clin. Pathol.* **46**:694–699.
49. Vemuganti, G. K., et al. 2005. Is microsporidial keratitis an emerging cause of stromal keratitis? A case series study. *BMC Ophthalmol.* **5**:19.
50. Visvesvara, G. S., et al. 1994. Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2760–2768.
51. Wanke, C. A., P. DeGirolami, and M. Federman. 1996. *Enterocytozoon bienersi* infection and diarrheal disease in patients who were not infected with human immunodeficiency virus: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* **23**:816–818.
52. Weber, R., and R. T. Bryan. 1994. Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patients. *Clin. Infect. Dis.* **19**:517–521.
53. Weber, R., et al. 1992. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The Enteric Opportunistic Infections Working Group. *N. Engl. J. Med.* **326**:161–166.
54. Weber, R., R. T. Bryan, D. A. Schwartz, and R. L. Owen. 1994. Human microsporidial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**:426–461.

3.5 Estudio 5: Variability in Minimal Genomes: Analysis of Tandem Repeats in the microsporidia *Encephalitozoon intestinalis*

Ana Galván^{a, b}, Angela Magnet^a, Fernando Izquierdo^a, Soledad Fenoy^a, Nuno Henriques-Gil^c and Carmen del Aguila^{a,*}.

^aLaboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, CP 28668, Boadilla del Monte, Madrid, Spain.

^bEscuela de Microbiología. Grupo de Parasitología. Universidad de Antioquia, Calle 67 No. 53-108, Medellín, Colombia. ^cLaboratorio de Genética, Facultad de Medicina, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, CP 28668, Boadilla del Monte, Madrid, Spain.

Aceptado para publicación en: *Infection, Genetics and Evolution* 2013; 20: 26-33.

Resumen

Estudios basados en el análisis de diferentes marcadores que incluyen la región ITS del ADN de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSU-RNA), segmentos del gen de la proteína del tubulo polar (PTP) y del gen de la proteína de la pared de la espora (SWP1), han descrito una variabilidad genética en las especies del género *Encephalitozoon*, *E. cuniculi* y *E. hellem*. En el caso de *E. intestinalis*, a pesar de ser la segunda especie de microsporidio más frecuente en humanos, hay muy pocos estudios que evalúen su variabilidad genética. En el presente estudio se evaluó la diversidad genética de diferentes cepas de *E. intestinalis* mediante la búsqueda y aplicación de nuevos marcadores genéticos con poder discriminatorio. El análisis de la secuencia del genoma de *E. intestinalis* permitió la identificación de 8 *loci* (M2, M2A, M3, M5, M7, M7A, M8 and PTP1) útiles para el estudio de polimorfismos en esta especie de microsporidio. Tres de los 8 marcadores genotípicos (M2, M7 y PTP1) presentaron secuencias idénticas entre las cepas evaluadas. Cuatro marcadores (M2A, M3, M7A y M8) fueron idénticos en 8 de las 9 cepas analizadas; siendo la única diferente, la secuencia de referencia publicada en GenBank (ATCC 50506). El análisis de las secuencias obtenidas con el marcador M5 permitió la definición de 2 genotipos entre las cepas estudiadas. Resalta la utilidad del marcador M5 para el estudio de la diversidad de *E. intestinalis* y se demuestra por primera vez una variabilidad genotípica en esta especie. Los *loci* definidos proporcionan nuevas oportunidades para la clasificación y la comparación de aislados de *E. intestinalis*, brindando información valiosa para la comprensión de aspectos biológicos y epidemiológicos de esta especie.



Variability in minimal genomes: Analysis of tandem repeats in the microsporidia *Encephalitozoon intestinalis*



Ana Galván^{a,b}, Angela Magnet^a, Fernando Izquierdo^a, Soledad Fenoy^a, Nuno Henriques-Gil^c, Carmen del Aguila^{a,*}

^a Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, CP 28668, Boadilla del Monte, Madrid, Spain

^b Escuela de Microbiología, Grupo de Parasitología, Universidad de Antioquia, Calle 67 No. 53-108, Medellín, Colombia

^c Laboratorio de Genética, Facultad de Medicina, Universidad San Pablo CEU, Urbanización Montepríncipe, CP 28668, Boadilla del Monte, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 April 2013

Received in revised form 23 July 2013

Accepted 24 July 2013

Available online 2 August 2013

Keywords:

Microsporidia

Encephalitozoon intestinalis

Genetic variability

Genotype

ABSTRACT

Microsporidia are ubiquitous fungi with genomes that have undergone a strong reduction to the extreme cases of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon intestinalis*. Genetic variability within species of the *Encephalitozoon* genus has been reported, with most of the studies based on the internal transcribed spacer (ITS) of the rDNA. However, in contrast to the picture of *E. cuniculi* and *Encephalitozoon hellem*, where different strains have been identified, no genetic variability has yet been observed in *E. intestinalis*. We have analysed tandem repeats included in putative coding sequences which could be used as polymorphic markers in *E. intestinalis*. Eight candidate loci (M2, M2A, M3, M5, M7, M7A, M8 and PTP1) were established and 9 *E. intestinalis* cultured strains from North America, South America and Europe were analysed. M2, M7 and PTP1 nucleotide sequences were identical among the different strains and the GenBank sequence. In contrast, we observed variants in 4 markers (M2A, M3, M7A and M8) which did not correspond to their respective reference sequences. The most noticeable finding was that with the M5 marker two genotypes were defined among the different strains studied, demonstrating genotypic variability of *E. intestinalis*. Although the diversity described is certainly not high, which can be explained by a lower chance of genetic variability in its minimal genome, we have demonstrated that polymorphisms actually exist in *E. intestinalis*. Epidemiological studies using this genetic marker should now be conducted to elucidate the genetic variability in *E. intestinalis* and improve our knowledge of the epidemiology of this microsporidia.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Special interest has been paid to minimal genomes in the last few years. Concerning prokaryotes, they have a practical application for the purpose of accomplishing synthetic forms of life (Gil et al., 2004; Shuler et al., 2012). Yet the idea of minimal genomes also addresses more fundamental questions about the essence of life itself (Juhas et al., 2011). However, when considering which genes are absolutely necessary for survival, there are some arbitrary concepts involved, as most organisms (heterotrophs) use a wide variety of products generated by others. This is particularly the case of parasites with a strong dependence on the host metabolism.

Among Eukaryotes, microsporidia have the most extreme genome reductions. Their fungal nature is now accepted and they

are considered as the earliest-diverging clade of sequenced fungi (Capella-Gutierrez et al., 2012). There are approximately 160 genera with more than 1300 species (Keeling, 2009; Lee et al., 2010; Peyrethallade et al., 2011), which parasite a wide range of vertebrate and invertebrate hosts (Didier, 2005; Didier and Weiss, 2008; Keeling, 2009). Eight genera and 14 species have been associated with human infections, among which *Enterocytozoon bien-eusi* and *Encephalitozoon intestinalis* are the most frequently reported, followed by *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem* (Didier, 2005; Didier and Weiss, 2006, 2008). These opportunistic pathogens cause a variety of systemic and nonsystemic diseases, with chronic diarrhea as the most common clinical manifestation (Didier, 2005; Didier and Weiss, 2006, 2008). Human microsporidia are recognized as emerging pathogens in immuno-compromised people, HIV/AIDS patients and organ transplant recipients among others, and they are also increasingly described in immunocompetent people (Abreu-Acosta et al., 2005; Didier, 2005; Didier and Weiss, 2008; Lopez-Velez et al., 1999; Lores et al., 2002). These species have also been identified in water sources as well as in wild, domestic and food-producing farm

* Corresponding author. Tel.: +34 91 372 4770 - 4784; fax: +34 91 351 04 96.

E-mail addresses: agalvandez@yahoo.com (A. Galván), angela.magnetdávila@ceu.es (A. Magnet), ferizqui@ceu.es (F. Izquierdo), sfenrod@ceu.es (S. Fenoy), nhengil@ceu.es (N. Henriques-Gil), cagupue@ceu.es (C. del Aguila).

animals, drawing attention to water-borne, food-borne and zoo-notic transmission (Anane and Attouchi, 2010).

Microsporidia genomes have suffered a large reduction to the extreme cases of *E. cuniculi* and *E. intestinalis* with 2.9 and 2.3 Mbp respectively (roughly half of the *Escherichia coli* genome), distributed in 11 linear chromosomes. The comparison of these two genomes showed that the size differences are due to the chromosome ends, while the chromosome gene cores and spacers are conserved. The rates of nucleotide changes in the intergenic spacers are lower than those of synonymous substitutions in coding sequences, meaning that they are probably as small as possible (Keeling and Corradi, 2011).

After long periods of time, different mutations should always become fixed in different lineages of a given species. Molecular epidemiological studies are generating a broader understanding about the wide demographic, geographic, zoonotic, and environmental range of human-infecting microsporidia like *E. bienersi*, *E. cuniculi* and *E. hellem* (Didier, 2005). Genotypical characterization of non-coding regions of the genome, such as the internal transcribed spacer (ITS) of the rRNA gene (rDNA) has already been demonstrated to possess informative polymorphisms that allow the differentiation between individual strains within a species (del Aguila et al., 2001a; Didier et al., 1995; Haro et al., 2003, 2006; Xiao et al., 2001a–c). The ITS is the only known polymorphic marker in *E. bienersi*, and it exhibits a very high degree of variability compared to the ITS of other microsporidia, probably due to its longer length (243 bp vs 28 to 45 bp in *E. hellem* and *E. cuniculi* respectively) (Henriques-Gil et al., 2010; Santin and Fayer, 2009; Thellier and Breton, 2008). Because of this high variability, new variants of the ITS fragment are frequently described making a genotype classification of *E. bienersi* difficult (Henriques-Gil et al., 2010; Santin and Fayer, 2009). Henriques-Gil et al. (2010) analysed 179 sequences of the ITS of *E. bienersi* with the aim of defining the phylogenetic relationships among genotypes and to relate the variability with the origins of the isolates. Four groups of sequences strongly differentiated from each other were detected, although most of the isolates (94%) corresponded to group I. Occasional sequences (groups II–IV) divergent from the “classic”

genotypes (group I) were obtained from different origins (Henriques-Gil et al., 2010).

With regards to genotype diversity within species of the *Encephalitozoon* genus, several studies based on variation in the ITS sequences of their rDNAs have been made (del Aguila et al., 2001a,b; Didier et al., 1995; Haro et al., 2003, 2005; Mathis et al., 1999; Pombert et al., 2013; Selman et al., 2013; Xiao et al., 2001a–c). For *E. cuniculi* a set of tetranucleotide repeats (5'-GTTT-3') in the ITS has been found to vary among isolates from different hosts, defining 4 different genotypes for this parasite (Asakura et al., 2006; Furuya, 2009; Mathis et al., 1999, 2005; Talabani et al., 2010; Xiao et al., 2001a–c). In the case of *E. hellem*, three genotypes differing in small insertions or deletions and some point mutations have been described by Mathis et al. (1999), with genotype I being the most frequently reported in humans and which has also been found in avian hosts (del Aguila et al., 2001b; Haro et al., 2003, 2005). Other polymorphic genetic markers, such as the PTP (polar tube protein) gene (Haro et al., 2003; Xiao et al., 2001a) and the intergenic spacers (IGS) IGS-TH and IGS-HZ (Haro et al., 2003), have also been used to characterise intraspecies variability in *E. hellem*, as well as the spore wall protein (SWP) gene in *E. cuniculi* (Xiao et al., 2001b). A comprehensive revision of the markers and genotypes studied in *E. cuniculi* and in *E. hellem* are given in Tables 1 and 2 respectively.

In contrast to the situation in *E. cuniculi* and *E. hellem*, where different strains have been identified, no genetic variability has yet been observed in *E. intestinalis* neither in the ITS nor in the PTP genes (del Aguila et al., 1998; Didier et al., 1996; Liguory et al., 2000; Rinder et al., 1999; Sobottka et al., 1999; Xiao et al., 2001b), although there has been a recent report of two point mutations in the ITS of two *E. intestinalis* isolates of HIV-infected individuals from Russia (Sokolova et al., 2011). Such systematic negative results are relevant because if *E. intestinalis* actually has a low or null variability it would imply a recent bottleneck to the origin of the whole species. However, it is also important to note that although spores of *E. intestinalis* have been detected in many different sources (human, animal and environmental samples), genotyping has only been conducted in a few samples. Additionally, as

Table 1
Genotypes of *E. cuniculi* isolates obtained with different polymorphic markers.

| <i>E. cuniculi</i> strain | Host | Isolate name | Origin | Location | ITS | | PTP | | SWP-1 | | References |
|---------------------------|-----------------|-------------------|-------------|-------------|------|----------|----------|----------|----------|--------------|------------------------|
| | | | | | GTTT | Genotype | Amplicon | Genotype | Amplicon | Genotype | |
| I (“rabbit strain”) | Rabbit | Strain I (Ja-r) | Kidney | USA | 3x | I | 363 | I | 399 | Ia | Xiao et al. (2001b) |
| | | CDC: V428A | Lens tissue | USA | 3x | I | 363 | I | 399 | Ia | Xiao et al. (2001b) |
| | | NIID:U2 | NA | Japan | 3x | I | 363 | I | 399 | Ia | Furuya (2009) |
| | Human | NIID:U5 | NA | Japan | 3x | I | 363 | I | 450 | Ib | Furuya (2009) |
| | | CDC: V385 | Kidney | USA | 3x | I | 363 | I | 399 | Ia | Xiao et al. (2001b) |
| | | CDC: V446 | Kidney | Italy | 3x | I | 363 | I | 450 | Ib | Xiao et al. (2001b) |
| II (“mouse strain”) | Mouse | Strain II (Va-m) | Kidney | USA | 2x | II | 363 | II | 363 | II | Xiao et al. (2001b) |
| | Wild rat | | | Switzerland | 2x | II | NA | NA | NA | NA | Mathis et al. (2005) |
| | Blue fox | | | Norway | 2x | II | NA | NA | NA | NA | Mathis et al. (2005) |
| | | | | Finland | | | | | | | |
| III (“dog strain”) | Dog | Strain III (Ja-d) | Kidney | USA | 4x | III | 285 | III | 429 | IIIb | Xiao et al. (2001b) |
| | Dog | Ca-d | Kidney | USA | 4x | III | 285 | III | 429 | IIIb | Xiao et al. (2001b) |
| | Human | CDC: V282 | Kidney | USA | 4x | III | 285 | III | 348 | IIIa | Xiao et al. (2001b) |
| | | | | | | | | | 429 | | |
| | | USP A-1 | Sputum | Spain | 4x | III | 285 | III | 348 | IIIa | Xiao et al. (2001b) |
| | | | | | | | | | 429 | | |
| | | USP-A-2 | Urine | Spain | 4x | III | 285 | III | 348 | IIIa | Xiao et al. (2001b) |
| | | | | | | | | | 429 | | |
| IV | | CDC: V449-A | Kidney | USA | 4x | III | 285 | III | 429 | IIIb | Xiao et al. (2001b) |
| | | 3275 | Kidney | Italy | 4x | III | 285 | III | NA | NA | Xiao et al. (2001b) |
| | Squirrel monkey | NIID:RS14 | NA | Japan | 4x | III | 363 | II | 333 | Unclassified | Asakura et al. (2006) |
| | Human | | Sputum | France | 5x | IV | NA | NA | NA | NA | Talabani et al. (2010) |
| | | | Urine | | | | | | | | |
| | | | Kidney | | | | | | | | |

NA: Not available.

Table 2Genotypes of *E. hellem* isolates obtained with different polymorphic markers.

| Isolate name | Origin | Location | Genotype | | | | | References |
|--------------|-------------|-------------|----------|----------|-----|--------|--------|--------------------------------------------------------------------|
| | | | ITS | SSU rRNA | PTP | IGS-TH | IGS-HZ | |
| IPZ:CH-H1 | Urine | Switzerland | 2 | NA | NA | NA | NA | Mathis et al. (1999) |
| IPZ:CH-H2 | Urine | Switzerland | 3 | NA | NA | NA | NA | Mathis et al. (1999) |
| IPZ:CH-H3 | Urine | Switzerland | 2 | NA | NA | NA | NA | Mathis et al. (1999) |
| IPZ:TZ-H13s | Sinus | Tanzania | 2 | NA | NA | NA | NA | Mathis et al. (1999) |
| CDC-V278 | Urine | Puerto Rico | 1A | 1A | 1A | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| CDC-V242 | Urine | USA | 1A | 1A | 1A | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| CDC-V274 | BAL | USA | 1A | 1A | 1A | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| Le | Conjunctiva | USA | 1A | 1A | 1A | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| CDC-V257 | Urine | USA | 1A | 1A | 1A | 1 | 1 | Haro et al. (2003), Xiao et al. (2001a) |
| CDC-V258 | Sputum | USA | 1A | 1A | 1A | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| CDC-V281 | Nasal | USA | 1A | 1A | 1A | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| Wo | Conjunctiva | USA | 1A | 1A | 1A | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| Ye | Cornea | USA | 1A | 1A | 1A | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| Ly | Cornea | USA | 1A | 1A | 1A | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| He | Conjunctiva | USA | 1A | 1A | 1B | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| CDC-V213 | Urine | USA | 1A | 1A | 1B | NA | NA | del Aguila et al. (2001b), Xiao et al. (2001a) |
| CDC-SP1 | BAL | Spain | 1A | 1A | 1B | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| EHVS96 | BAL | Spain | 1A | NA | 1B | 2 | 1 | Haro et al. (2003), Xiao et al. (2001a) |
| LEPV-2-93 | BAL | Italy | 1A | 1A | 1B | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| PV-3-93 | BAL | Italy | 1A | 1A | 1B | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| PV-8-95 | Sputum | Italy | 1A | 1C | 1C | 2 | 2 | del Aguila et al. (2001b), Haro et al. (2003), Xiao et al. (2001a) |
| M1APV4-94 | BAL | Italy | 1A | NA | 1C | 2 | 2 | del Aguila et al. (2001b), Haro et al. (2003), Xiao et al. (2001a) |
| PV-6-95 | NA | Italy | 1A | NA | 1C | 2 | 2 | Haro et al. (2003), Xiao et al. (2001a) |
| VRPV-1-93 | Urine | Italy | 1A | 1C | 1C | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| PV-5-95 | BAL | Italy | 1A | 1C | 1C | 2 | 2 | del Aguila et al. (2001b), Haro et al. (2003), Xiao et al. (2001a) |
| PV-11-98 | Nasal | Italy | 1A | 1C | 1C | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| PV-10-97 | Ocular | Italy | 1A | 1C | 1C | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| PV-10-97E1A | Sputum | Italy | 1A | 1C | 1C | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| M1APV-6-95 | BAL | Italy | 1A | 1C | 1C | NA | NA | del Aguila et al. (2001b), Xiao et al. (2001a) |
| PV-9-96 | BAL | Italy | 1A | 1C | 1C | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| CDC-V261 | Urine | Switzerland | 2B | 2B | 2B | NA | NA | Xiao et al. (2001a) |
| PV-7-95 | NA | Italy | 2D | NA | 2C | 3 | 3 | del Aguila et al. (2001b), Haro et al. (2003), Xiao et al. (2001a) |

NA: Not available.

mentioned above, the ribosomal ITS is very short in this species. Therefore, the strategy to find polymorphic markers should include other candidate sequences and biological samples of dissimilar origins. In this work we analyse eight sequences that include short tandem repeats (STR) from different chromosomes of *E. intestinalis*. The classification of different strains creates the opportunity to make hypothetical correlations with infectivity, clinical symptoms and drug-resistance, as well as vital information in understanding the epidemiology and the geographical distribution of different strains.

2. Material and methods

2.1. Strains

In this study we used 9 cultured strains obtained from AIDS patients from different geographical regions. A more detailed description of the strains included is given in Table 3. Each strain was cultured on Vero-E6 cells according to the method described by Visvesvara et al. (1991), except for the Dutch and Colombian strains, for which purified spores were used directly for DNA extraction.

2.2. DNA extraction and purification

DNA was extracted by bead disruption of spores using the Fast-DNA-Spin soil kit following the protocol described by Da Silva et al. (1999). PCR inhibitors were removed by using NucleoSpin® Extract II kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Table 3*E. intestinalis* strains used in this study.

| Patient no. ^a | Location | Samples obtained | Strain name |
|--------------------------|------------------|------------------------------|-------------------------|
| 1 | New York (USA) | Bronchoalveolar lavage (BAL) | ATCC 50506 ^b |
| 2 | California (USA) | Duodenal aspirate | CDC:V304 |
| 3 | Colorado (USA) | Urine | CDC:V308 ^c |
| | | Sputum | CDC:V309 ^c |
| 4 | California (USA) | Sputum | CDC:V315 ^c |
| 5 | Colorado (USA) | Urine | CDC:V324 ^c |
| | | Sputum | CDC:V325 ^c |
| 6 | Colombia | Stool | Ei-Col ^d |
| 7 | The Netherlands | Stool | Ei-Dutch |

^a All patients were males with HIV/AIDS.^b ATCC 50506 was purchased from ATCC's strains collection (Lot/Batch No. 1076738).^c Data from these patients are from a previous report del Aguila et al. (1998).^d Data from this patient are from a previous report Bedoya et al. (2008).

2.3. Loci analysed and PCR

Tandem Repeat Finder 4.04 program (Benson, 1999), with the default parameters set for alignment weights, and a minimum alignment score of 50 and a maximum period size of 500, was used to analyse the DNA sequences from the 11 chromosomes of *E. intestinalis* ATCC 50506 reference strain (GenBank accession numbers CP001943–CP001952). Eight candidate loci were established, all of them in putative coding sequences (the gene labels are given in Table 4): M2 and M2A on chromosome 2; M3 on chromosome 3; M5 on chromosome 5; M7 and M7A on chromosome VII; M8 on

Table 4

DNA regions studied and primer pairs used in this study.

| Marker | Chromosome | DNA studied region | Primer | Sequence (5'–3') | Annealing temp (°C) | Expected amplicon size | Obtained amplicon size |
|--------|------------|--------------------------------------------------------------|---------------|-------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| M2 | 2 | Hypothetical protein (Eint_020110) (mRNA) | CR2 (upper) | CCCAAACCTCTGAACTAAT | 52 | 665 | 665 |
| | | | CR2 (lower) | CCGCAGAAATTTAATAGTAAT | | | |
| M2A | 2 | Hypothetical protein (Eint_020090) | CR2A (upper) | CCTCCCAATCCCGATGA | 56 | 490 | 502 |
| | | | CR2A (lower) | TTTGTCCTTTCTTCCTAACCC | | | |
| M3 | 3 | DNA-directed RNA polymerase II largest subunit (Eint_030180) | CR3 (upper) | ATCAATCTTCTGTGGCTAGA | 56 | 534 | 659 |
| | | | CR3 (lower) | GCCTGTAACCTCCGGTGATTA | | | |
| M5 | 5 | Hypothetical protein (Eint_051610) | CR5 (upper) | TAACTTAATCATTAAACGCCATA | 52 | 834 | 834 ^a |
| | | | CR5 (lower) | TTCAAAGGAATCTAGCACT | | | 828 ^b |
| PTP1 | 6 | PTP-1 | PTP-A (upper) | CTGAAAAGAGATTAGGAGTGCC | 55 | 780 | 780 |
| | | | PTP-A (lower) | AAGCAGCTGTTACCATCTTAC | | | |
| | | | PTP-B (upper) | CGGGAATTGCACTATTGTAGTA | 55 | 666 | 666 |
| | | | PTP-B (lower) | AACACGAGGCTGTCATAC | | | |
| M7 | 7 | Anti-silencing protein 1 (Eint_070060) | CR7 (upper) | TCTGTTTCTCCGCTACACCT | 52 | 577 | 577 |
| | | | CR7 (lower) | AGCGTGGAGTCGAGTTTGT | | | |
| M7A | 7 | Hypothetical protein (Eint_071510) | CR7A (upper) | CAACGCATTGTCCAACCTA | 56 | 591 | 704 |
| | | | CR7A (lower) | TTCCTTCTGCTTTCGCTGACT | | | |
| M8 | 8 | Hypothetical protein (Eint_081940) | CR8 (upper) | GACTCCCTTCCGTTTC | 56 | 777 | 1085 |
| | | | CR8 (lower) | TAATTGGGAGAACATAATGCTT | | | |

^a M5 Type I.^b M5 Type II.

chromosome 8 and PTP-1 on chromosome 6. For the last one, two pairs of primers were designed to amplify the complete PTP1 gene in two overlapping fragments. Primers were generated with the program OLIGO 6.23 (Molecular Biology Insights Co.). The corresponding DNA region analysed in each chromosome and primer pairs characteristics are described in Table 4. The PCR amplifications were made with a GenAmp kit (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) according to the manufacturer's procedures with 0.2 mM concentrations of deoxynucleoside triphosphates, 0.2 µM concentrations of each primer, buffer with MgCl₂ 1X and 1.25 U of *Taq* polymerase. PCR was performed in a Gene Amp[®] PCR system 9700 thermocycler (Perkin Elmer) using the following programme: 95 °C for 5 min, 40 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at the annealing temperature (specific for each primer pair see Table 4), and 1 min at 72 °C; followed by a final step at 72 °C for 10 min. PCR products were analysed by electrophoresis in 2% agarose gel stained with ethidium bromide and examined under UV light. The size of the amplicons was compared with the standard 100 bp DNA ladder.

2.4. DNA sequencing

PCR products were purified according to the manufacturer's instructions using the NucleoSpin[®] Extract II kit (MACHEREY-NA-GEL GmbH & Co. KG, Germany). Sequencing was carried out in both directions by the sequencing service of MACROGEN Korea. The resulting sequences were edited and aligned with the Bioedit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 (Hall, 1999).

Table 5

Comparison of the genotype results obtained with *E. intestinalis* strains at each genetic locus. The reference sequences obtained from the Genome Project are designated as type-I, whereas the other, when different, as type-II.

| | Strain | | | | | | | |
|------|-------------------|------------|----------|-----------------------------|----------|--------|----------|-----------------------------|
| | Genbank reference | ATCC 50506 | CDC:V315 | CDC: V324/V325 ^a | Ei-Dutch | Ei-Col | CDC:V304 | CDC: V308/V309 ^b |
| M2 | I | I | I | I | I | I | I | I |
| M7 | I | I | I | I | I | I | I | I |
| PTP1 | I | I | I | I | I | I | I | I |
| M2A | I | II | II | II | II | II | II | II |
| M3 | I | II | II | II | II | II | II | II |
| M7A | I | II | II | II | II | II | II | II |
| M8 | I | II | II | II | II | II | II | II |
| M5 | I | I | I | I | I | I | II | II |

^a Isolated from the same patient.^b Isolated from the same patient.

2.5. Nucleotide sequence accession numbers

The new sequences derived from this study have been deposited in the GenBank database.

3. Results

Nucleotide sequences of eight different loci were obtained from 9 *E. intestinalis* cultured strains and compared with the reference sequence published on GenBank, following the Genome Project for this species (Corradi et al., 2010). Amplicons of the M2, PTP1 and M7 markers had the expected size (Table 4) and nucleotide sequences were identical for all the strains analysed and the GenBank reference sequence. A single amplicon was also obtained for M2A, M3, M5, M7A and M8. However, the variants for M2A, M3, M5, M7A and M8 observed in our study did not correspond to the expected size (Table 4) and the sequence of the respective GenBank reference. The latter was named Type I, and the new variants Type II (Table 5). Type II of the M2A sequence revealed a degenerated repetitive region of 12 bp (5 times) in the 9 *E. intestinalis* strains studied, including ATCC 50506, but it was present in only 4 of the Genbank sequence (Type I) (Fig. 1; Supplementary Fig. S1). Type II M3 sequence showed a 13 degenerated tandem re-peat sequence of 21 bp, while Type I M3 had only 7 (Fig. 1; Supplementary Fig. S1). The analysis of the M5 marker defines two genotypes among the different strains included in the study. A 3 bp (AAC) tandem repeat was found 7 times in M5 Type I – found in the GenBank reference sequence, our ATCC 50506 strain,

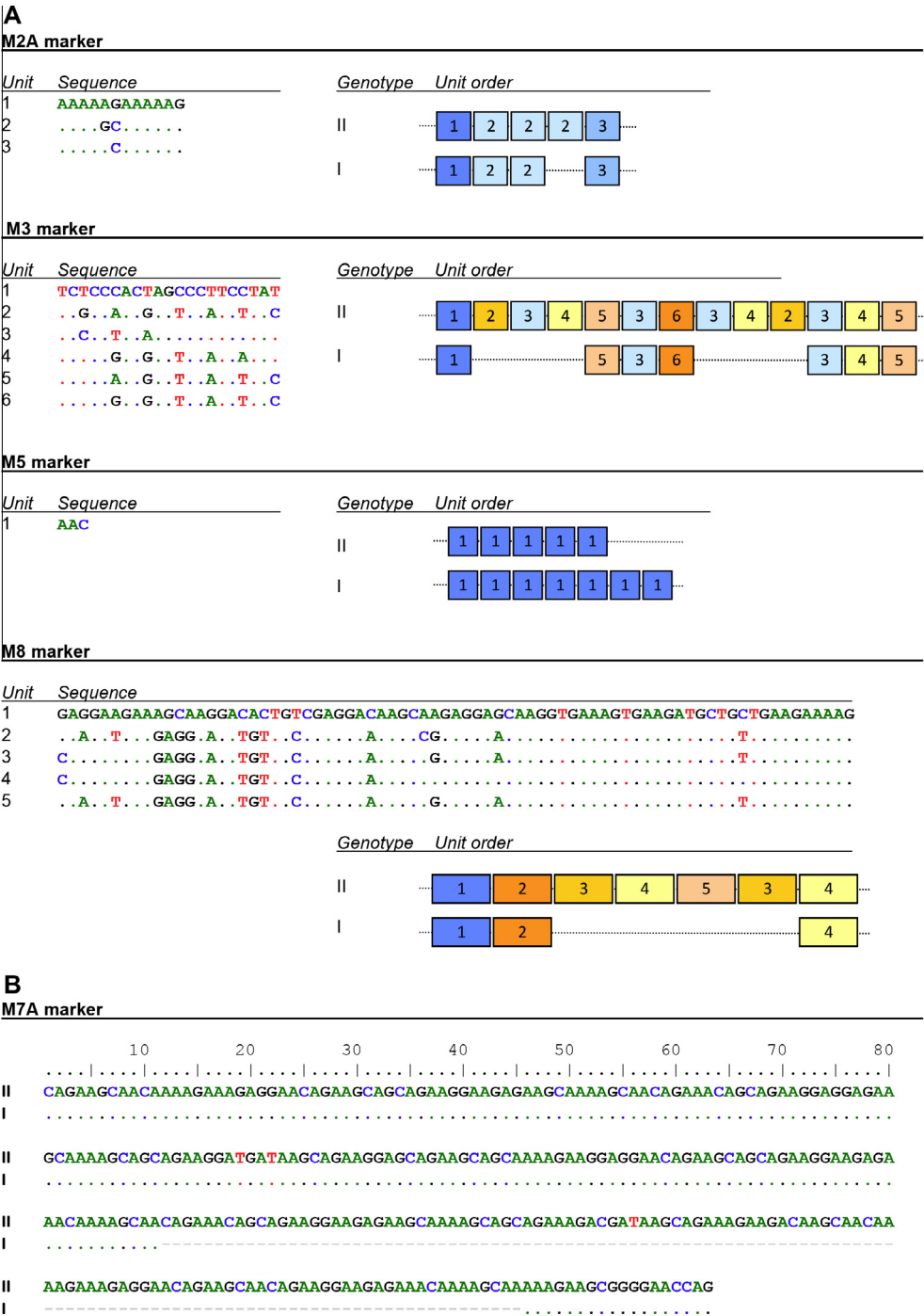


Fig. 1. (A) Organization of the repeated units for the markers M2A, M3, M5 and M8. The point differences of the degenerated repeats are given respect to the correspondent first unit (1). For each marker, the two genotypes differ in the insertion/deletion of several entire units. (B) Sequence diversity in the M7A marker among genotypes I and II. Dots denote sequence identity and dashes denote nucleotide deletions.

CDC:V315, CDC:V324, CDC:V325, Ei-Dutch and Ei-Col – and only five times in M5 Type II, obtained from the CDC:V304, CDC:V308, and CDC:V309 strains (Fig. 1). M7A marker corresponds to a protein domain rich in Lysine, Aspartic Acid, Glutamic Acid, and Glutamine; relative to Type I, Type II has 38 additional codons for those amino-acids (Fig. 1; Supplementary Fig. S1). Finally, for M8 marker, Type II sequence has a 7 tandem degenerated repeats of 75 bp which is only repeated three times in Type I (Fig. 1; Supplementary Fig. S1). It is noteworthy that the repeats for M3 and M8 differ in specific point changes, most of them synonymous (all of them for M3 and two missense for M8), and identical repeats are placed in different positions.

E. intestinalis Type II sequences of the M2A, M3, M5, M7A and M8 markers are available from GenBank under accession numbers JX399797, JX399800, JX399801, JX399798, JX399799, respectively.

4. Discussion

Although microsporidia were considered to be early branching eukaryotes, they are now widely accepted as very unusual parasitic fungi with many typical eukaryotic features simplified, reduced or completely lost (Keeling and Corradi, 2011; Peyretailade et al., 2011). Microsporidia genome compaction is associated with a

tightly packed gene organization and small non-coding sequences resulting in some extraordinary characteristics including overlapping genes and a slow rate of arrangements (Corradi et al., 2007; Slamovits et al., 2004). The *E. intestinalis* genome is organized into 11 linear chromosomes, even smaller in size than that of *E. cuniculi* (Corradi et al., 2010; Peyretailade et al., 2011). Differences between both microsporidia are mainly due to the large subtelomeric regions found in most of the *E. cuniculi* chromosomes but missing in the *E. intestinalis* genome (Peyretailade et al., 2011), with a loss of a massive amount of genes commonly referred to as “hypothetical proteins” or “orphan proteins” for which there are no putative functions assigned and which have proven to be non-essential for *E. intestinalis*. On the contrary, losses within *E. intestinalis* chromosomal “cores” are virtually non-existent, having a similar pattern to *E. cuniculi* (Peyretailade et al., 2011). Additionally, the extremely short introns and reduced intergenic spacers in *E. intestinalis* are remarkably well-conserved at the sequence level (Corradi et al., 2010) and have been shown to evolve at a slower rate compared to their surrounding genes, so these regions appear to have reached an irreducible minimum (Keeling and Corradi, 2011) and any rearrangement could have a severe impact on the *E. intestinalis* genome architecture, giving little opportunity for an intraspecific diversity in this parasite.

Genotypic characterization of microsporidia is a helpful tool in understanding the transmission and epidemiology of microsporidiosis. Since the description of the 3 genotypes of *E. cuniculi* by Didier et al. (1995), several studies on genetic variation in human pathogenic microsporidia, besides *E. cuniculi*, have been described, including *E. hellem*, *E. bienersi* and *E. intestinalis* (del Aguila et al., 1998, 2001a,b; Didier et al., 1995; Furuya, 2002; Haro et al., 2003, 2006; Liguory et al., 2000; Mathis et al., 1999; Sobottka et al., 1999; Xiao et al., 2001a–c). Most of these studies used genotypic markers such as the ITS, PTP1 and SWP1 genes. Recently, new studies on variability in *E. cuniculi* have been described (Pombert et al., 2013; Selman et al., 2013). In particular, results obtained by Pombert et al. (2013) suggest several molecular markers that may have a greater resolution than those used until now (such as the ITS region). Among them, eukaryotic translation initiation factor 2, translation elongation factor EF-1 alpha, and U2 snRNP/pre-mRNA association factor were the most promising.

Although *E. intestinalis* is the second most frequent microsporidia in humans, to date there have been few studies concerning the variability of this parasite (del Aguila et al., 1998; Didier et al., 1996; Doultree et al., 1995; Fedorko et al., 2001; Graczyk et al., 2002; Liguory et al., 2000; Valencakova et al., 2012; Xiao et al., 2001b), and none of them have revealed any genetic differences among isolates. This may have been influenced by the lack of data on the genome sequence of the parasite. However, since the publication of the *E. intestinalis* genome by Corradi et al. (2010), the searching of new variable regions has been made easier. This paper describes the genetic characterization of 9 *E. intestinalis* strains using 8 genotypic markers from various chromosomes. Given the fact that the *E. intestinalis* genome is the smallest known eukaryotic genome with a haploid size of 2.3 Mbp, it has a high gene density (0.86 genes per Kb) and very few introns (Corradi et al., 2010), all the regions studied correspond to coding sequences of this microsporidia, most of them with an unknown function. This fact limited the comparison with other genotypic markers studied in these parasites, such as those described by Pombert et al. (2013). It is important to mention that TRF program searches for a wide number of possible repeats and the loci selected here were those that appeared worthy of analysis (Benson, 1999). Thus, the presence of other STR can be virtually discarded in the genome of *E. intestinalis*, confirming the extreme genome reduction and conservation noted by Keeling and Corradi (2011).

Three out of the 8 genotypic markers used in our study (M2, M7 and PTP1) were uniform for all the strains evaluated. One of these markers, the PTP1 gene, proved to be useful in the definition of different genotypes both for *E. cuniculi* (Asakura et al., 2006; Xiao et al., 2001b,c) and *E. hellem* (Haro et al., 2003; Xiao et al., 2001a,b). However, in the case of *E. intestinalis*, a complete identity in the nine strains agreed with that reported by Xiao et al. (2001b), who also studied the PTP1 locus from 11 *E. intestinalis* isolates. In fact, the identity among *E. intestinalis* isolates is the typical outcome of antigenic and molecular biology-based analyses (del Aguila et al., 1998; Didier et al., 1996; Doultree et al., 1995; Fedorko et al., 2001; Graczyk et al., 2002; Liguory et al., 2000; Valencakova et al., 2012). On the basis of those studies, *E. intestinalis* has been shown to be similar. Del Aguila et al. (1998) evaluated eight isolates of *E. intestinalis* by SDS-PAGE and immunoblotting and found similarities of the protein profiles of several of these isolates. Sobottka et al. (1999) evaluated inter- and intra-species variations among *Encephalitozoon* species by pulsed-field gel electrophoresis, and, while different banding patterns existed for *E. cuniculi* strains and also for *E. hellem* isolates, identical chromosomal patterns with *E. intestinalis* isolates from geographically diverse regions (CDC: V307 and IP2-D-H11) were observed, suggesting that *E. intestinalis* strains may be more closely related than *E. cuniculi* or *E. hellem* respective isolates. Liguory et al. (2000) analysed the ITS sequences of 13 unrelated *E. intestinalis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients with intestinal microsporidiosis, the identity of all of them suggesting that this parasite probably had a clonal distribution in the patients. Fedorko et al. (2001) using single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of a phylogenetically conserved region of the SSUrRNA gene obtained the same pattern for 3 isolates of *E. intestinalis*. Graczyk et al. (2002) analysed the full length SSUrRNA from *E. intestinalis* spores of fecal samples of 3 free-ranging human-habituated mountain gorillas in Uganda, and a single genotype was again obtained. Moreover, it was identical to GenBank sequences of human origin. Valencakova et al. (2012) found no genetic heterogeneity among the large subunit (LSU) rRNA gene and the ITS region, among the isolates of *E. intestinalis* from swine. Other genetic markers have also been shown to be homogeneous among *E. intestinalis* isolates, Lee et al. (2010) found that a sex-related locus from 3 strains of this parasite was very similar (>99%).

It is important to point out that, as our results differ from the GenBank reference sequence, a diversity of sequences seems to exist for the markers M2A, M3, M7A and M8. Although a noteworthy objection is that only the GenBank sequence shows the type-I, while all the strains evaluated, including ATCC 50506 strain, which was used in the *E. intestinalis* genome project, share the same type-II sequence. One possible explanation is that instead of real variability, such disagreement would reflect sequencing errors of the *E. intestinalis* genome, which are known to occur occasionally after whole-genome shotgun sequencing (Myers, 1999). Complete sequencing and assembly might introduce occasional errors, particularly when tandem repeats are involved. However, this is unlikely, because the assembly coverage of the *E. intestinalis* genome project was extremely high and good (Corradi et al., 2010) and additionally, differences between alleles are far from random, affecting triplets 3rd base (random errors would never respect patterns of expression) or whole repeated units. This is particularly clear for M3 and M8 where the repeated units differ in several point substitutions, not only are most of them synonymous, but they are also reorganized but conserve the same types of units. The most plausible explanation is that our ATCC 50506 and the one used for the *E. intestinalis* genome project, although catalogued under the same name, actually correspond to different substrains. Obtaining the material originally used to the complete genome

sequencing should solve this question but unfortunately it is no longer available.

The most noticeable finding of this study is that for the first time we demonstrate the existence of variability in *E. intestinalis*. In addition to the above markers, the reference sequence was also obtained for M5 from some strains from the USA, Colombia and The Netherlands, but 3 other share a different genotype II (Table 5). Hence, the M5 locus seems to be a good marker for *E. intestinalis* genotype analysis in further studies. This locus corresponds to a “hypothetical protein”, to date, of unknown function, so any physiologic effect of this polymorphism cannot yet be ascribed by mutation. It should be interesting to evaluate isolates from different sources (human, animal and environmental samples) and from different geographical origins to define the typing resolution of M5 locus; it appears to be a good candidate in which to find further variations affecting the number of repeated units. Moreover, the biological and epidemiological significance of our findings remain to be elucidated due to the type of samples analysed (only cultured strains), source (all from humans) and geographical origin (seven of the nine strains were from the USA).

5. Conclusion

To our knowledge this is the first study that has shown genotypic variability of *E. intestinalis* strains. Moreover, several genotypic markers different from ITS were used for the first time to analyse the nine strains included in our study. In summary, the results of this study suggest the existence of a low genetic diversity in the 9 *E. intestinalis* strains evaluated. Such minimal variability would imply, firstly, a strong natural selection against any change in such a minimal genome and, secondly, considering that neutral mutations are always possible, that *E. intestinalis* would have arisen recently from a single origin. *E. intestinalis* genetic diversity observed in our study is certainly not high, which is still in line with the mentioned low opportunities in a minimal genome. Nevertheless, our results clearly show that polymorphisms actually exist in *E. intestinalis*. Additionally, the loci defined provide new opportunities for the classification and comparison of isolates and, hence, to establish hypothetical correlations with infectivity, clinical symptoms and drug-resistance, as well as vital information in understanding the epidemiology and the geographical distribution of different strains.

Acknowledgements

The authors are indebted to Sergio Llorens for his valuable technical assistance and to Brian Crilly for helpful revision of the manuscript. We thank Dr G.S. Visvesvara for providing 6 of the 9 *E. intestinalis* strains included in the study (CDC: V304, CDC: V308, CDC: V309, CDC: V315, CDC: V324, CDC: V325). We would also like to thank Dr Thomas Van Gool and the parasitology laboratory from the University of Antioquia (Colombia) for providing *E. intestinalis* Dutch and Colombian spores respectively. This work was funded by grant PI061593 from Instituto de Salud Carlos III (FISS). Ana Luz Galván Díaz was supported in Spain by an overseas fellowship from Colciencias (Antioquia University, Colombia). Angela Magnet was supported by Ministerio de Educación y Ciencia de España (FPU grant AP2009-0415).

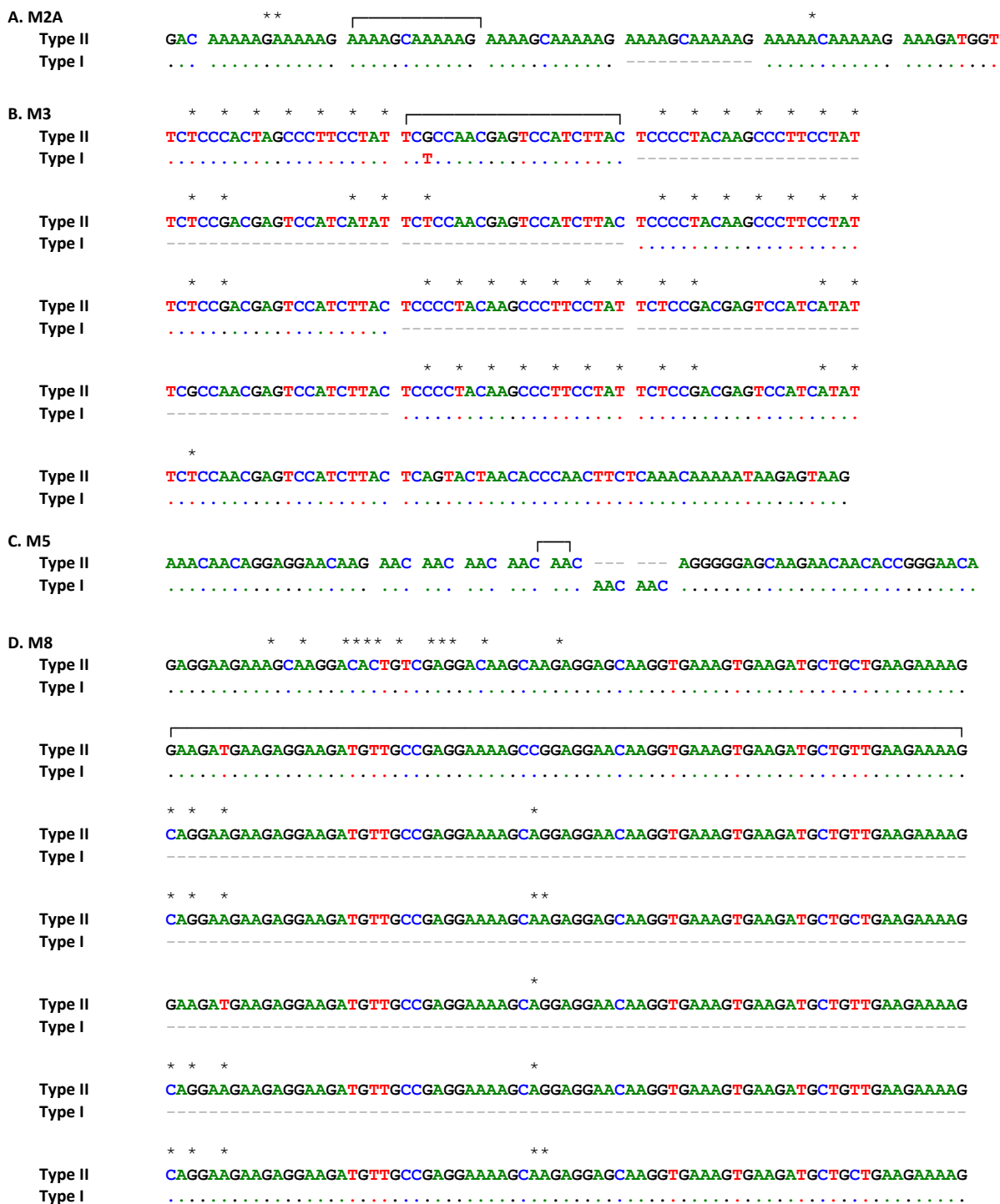
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.024>.

References

- Abreu-Acosta, N., Lorenzo-Morales, J., Leal-Guio, Y., Coronado-Alvarez, N., Foronda, P., Alcoba-Florez, J., Izquierdo, F., Batista-Diaz, N., Del Aguila, C., Valladares, B., 2005. *Enterocytozoon bienersi* (microsporidia) in clinical samples from immunocompetent individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 848–855.
- Anane, S., Attouchi, H., 2010. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 34, 450–464.
- Asakura, T., Nakamura, S., Ohta, M., Une, Y., Furuya, K., 2006. Genetically unique microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* strain type III isolated from squirrel monkeys. *Parasitol. Int.* 55, 159–162.
- Bedoya, K., Montoya, M.N., Botero, J., Galván, A.L., 2008. [First isolate of *Encephalitozoon intestinalis* from stools of a Colombian patient with AIDS]. *Biomedica* 28, 441–447.
- Benson, G., 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27, 573–580.
- Capella-Gutierrez, S., Marcet-Houben, M., Gabaldon, T., 2012. Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biol.* 10, 47.
- Corradi, N., Akiyoshi, D.E., Morrison, H.G., Feng, X., Weiss, L.M., Tzipori, S., Keeling, P.J., 2007. Patterns of genome evolution among the microsporidian parasites *Encephalitozoon cuniculi*, *Antonospora locustae* and *Enterocytozoon bienersi*. *PLoS ONE* 2, e1277.
- Corradi, N., Pombert, J.F., Farinelli, L., Didier, E.S., Keeling, P.J., 2010. The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nat. Commun.* 1, 77.
- da Silva, A.J., Bornay-Llinares, F.J., Moura, I.N., Slemenda, S.B., Tuttle, J.L., Pieniazek, N.J., 1999. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. *Mol. Diagn.* 4, 57–64.
- del Aguila, C., Croppo, G.P., Moura, H., Da Silva, A.J., Leitch, G.J., Moss, D.M., Wallace, S., Slemenda, S.B., Pieniazek, N.J., Lal, A.A., Visvesvara, G.S., 1998. Ultrastructure, immunofluorescence, western blot, and PCR analysis of eight isolates of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* established in culture from sputum and urine samples and duodenal aspirates of five patients with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1201–1208.
- del Aguila, C., Moura, H., Fenoy, S., Navajas, R., Lopez-Velez, R., Li, L., Xiao, L., Leitch, G.J., da Silva, A., Pieniazek, N.J., Lal, A.A., Visvesvara, G.S., 2001a. In vitro culture, ultrastructure, antigenic, and molecular characterization of *Encephalitozoon cuniculi* isolated from urine and sputum samples from a Spanish patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1105–1108.
- del Aguila, C., Rueda, C., Haro, M., Scaglia, M., Gatti, S., Bornay-Llinares, F.J., Fenoy, S., Henriques-Gil, N., 2001b. Genetic and immunologic characterization of seven *Encephalitozoon hellem* human strains. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2 (Suppl.), 665–685.
- Didier, E.S., 2005. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop.* 94, 61–76.
- Didier, E.S., Weiss, L.M., 2006. Microsporidiosis: current status. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19, 485–492.
- Didier, E.S., Weiss, L.M., 2008. Overview of microsporidia and microsporidiosis. *Protistology* 5, 243–255.
- Didier, E.S., Vossbrinck, C.R., Baker, M.D., Rogers, L.B., Bertucci, D.C., Shaddock, J.A., 1995. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* 111 (Pt 4), 411–421.
- Didier, E.S., Rogers, L.B., Orenstein, J.M., Baker, M.D., Vossbrinck, C.R., Van Gool, T., Hartskeerl, R., Soave, R., Beaudet, L.M., 1996. Characterization of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43, 34–43.
- Doultree, J.C., Maerz, A.L., Ryan, N.J., Baird, R.W., Wright, E., Crowe, S.M., Marshall, J.A., 1995. In vitro growth of the microsporidian *Septata intestinalis* from an AIDS patient with disseminated illness. *J. Clin. Microbiol.* 33, 463–470.
- Fedorok, D.P., Nelson, N.A., Didier, E.S., Bertucci, D., Delgado, R.M., Hruszkewycz, A.M., 2001. Speciation of human microsporidia by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 397–401.
- Furuya, K., 2002. Genotyping of *Encephalitozoon cuniculi* isolates found in Hokkaido. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55, 128–130.
- Furuya, K., 2009. Spore-forming microsporidian *encephalitozoon*: current understanding of infection and prevention in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62, 413–422.
- Gil, R., Silva, F.J., Pereto, J., Moya, A., 2004. Determination of the core of a minimal bacterial gene set. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 518–537.
- Graczyk, T.K., Bosco-Nizeyi, J., da Silva, A.J., Moura, I.N., Pieniazek, N.J., Cranfield, M.R., Lindquist, H.D., 2002. A single genotype of *Encephalitozoon intestinalis* infects free-ranging gorillas and people sharing their habitats in Uganda. *Parasitol. Res.* 88, 926–931.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Haro, M., Del Aguila, C., Fenoy, S., Henriques-Gil, N., 2003. Intraspecies genotype variability of the microsporidian parasite *Encephalitozoon hellem*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4166–4171.
- Haro, M., Izquierdo, F., Henriques-Gil, N., Andres, I., Alonso, F., Fenoy, S., del Aguila, C., 2005. First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3153–3157.

- Haro, M., Henriques-Gil, N., Fenoy, S., Izquierdo, F., Alonso, F., Del Aguila, C., 2006. Detection and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in pigeons. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 (Suppl. 1), S58–60.
- Henriques-Gil, N., Haro, M., Izquierdo, F., Fenoy, S., del Aguila, C., 2010. Phylogenetic approach to the variability of the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* and its implications for inter- and intrahost transmission. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3333–3342.
- Juhas, M., Eberl, L., Glass, J.I., 2011. Essence of life: essential genes of minimal genomes. *Trends Cell Biol.* 21, 562–568.
- Keeling, P., 2009. Five questions about microsporidia. *PLoS Pathog.* 5, e1000489.
- Keeling, P.J., Corradi, N., 2011. Shrink it or lose it: balancing loss of function with shrinking genomes in the microsporidia. *Virulence* 2, 67–70.
- Lee, S.C., Corradi, N., Doan, S., Dietrich, F.S., Keeling, P.J., Heitman, J., 2010. Evolution of the sex-related locus and genomic features shared in microsporidia and fungi. *PLoS ONE* 5, e10539.
- Liguory, O., Fournier, S., Sarfati, C., Derouin, F., Molina, J.M., 2000. Genetic homology among thirteen *Encephalitozoon intestinalis* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected patients with intestinal microsporidiosis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2389–2391.
- Lopez-Velez, R., Turrientes, M.C., Garron, C., Montilla, P., Navajas, R., Fenoy, S., del Aguila, C., 1999. Microsporidiosis in travelers with diarrhea from the tropics. *J. Travel Med.* 6, 223–227.
- Lores, B., Lopez-Miragaya, I., Arias, C., Fenoy, S., Torres, J., del Aguila, C., 2002. Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus-negative patients from Vigo, Spain. *Clin. Infect. Dis.* 34, 918–921.
- Mathis, A., Tanner, I., Weber, R., Deplazes, P., 1999. Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *Int. J. Parasitol.* 29, 767–770.
- Mathis, A., Weber, R., Deplazes, P., 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 423–445.
- Myers, G., 1999. Whole-genome DNA sequencing. *Comput. Sci. Eng.* 1, 33–43.
- Peyretailade, E., El Alaoui, H., Diogon, M., Polonais, V., Parisot, N., Biron, D.G., Peyret, P., Delbac, F., 2011. Extreme reduction and compaction of microsporidian genomes. *Res. Microbiol.* 162, 598–606.
- Pombert, J.F., Xu, J., Smith, D.R., Heiman, D., Young, S., Cuomo, C.A., Weiss, L.M., Keeling, P.J., 2013. Complete genome sequences from three genetically distinct strains reveal high intraspecies genetic diversity in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Eukaryot. Cell* 12, 503–511.
- Rinder, H., Katzwinkel-Wladarsch, S., Thomschke, A., Loscher, T., 1999. Strain differentiation in microsporidia. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 23, 433–437.
- Santin, M., Fayer, R., 2009. Enterocytozoon bieneusi genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence. a consensus. *J. Eukaryot. Microbiol.* 56, 34–38.
- Selman, M., Sak, B., Kvac, M., Farinelli, L., Weiss, L.M., Corradi, N., 2013. Extremely reduced levels of heterozygosity in the vertebrate pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Eukaryot. Cell* 12, 496–502.
- Shuler, M.L., Foley, P., Atlas, J., 2012. Modeling a minimal cell. *Methods Mol. Biol.* 881, 573–610.
- Slamovits, C.H., Fast, N.M., Law, J.S., Keeling, P.J., 2004. Genome compaction and stability in microsporidian intracellular parasites. *Curr. Biol.* 14, 891–896.
- Sobottka, I., Albrecht, H., Visvesvara, G.S., Pieniazek, N.J., Deplazes, P., Schwartz, D.A., Laufs, R., Elsner, H.A., 1999. Inter- and intra-species karyotype variations among microsporidia of the genus *Encephalitozoon* as determined by pulsed-field gel electrophoresis. *Scand. J. Infect. Dis.* 31, 555–558.
- Sokolova, O.I., Demyanov, A.V., Bowers, L.C., Didier, E.S., Yakovlev, A.V., Skarlato, S.O., Sokolova, Y.Y., 2011. Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2102–2108.
- Talabani, H., Sarfati, C., Pillebout, E., van Gool, T., Derouin, F., Menotti, J., 2010. Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2651–2653.
- Thellier, M., Breton, J., 2008. *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 15, 349–358.
- Valencakova, A., Balent, P., Ravaszova, P., Horak, A., Obornik, M., Halanova, M., Malcekova, B., Novotny, F., Goldova, M., 2012. Molecular identification and genotyping of Microsporidia in selected hosts. *Parasitol. Res.* 110, 689–693.
- Visvesvara, G.S., Leitch, G.J., Moura, H., Wallace, S., Weber, R., Bryan, R.T., 1991. Culture, electron microscopy, and immunoblot studies on a microsporidian parasite isolated from the urine of a patient with AIDS. *J. Protozool.* 38, 105S–111S.
- Xiao, L., Li, L., Moura, H., Sulaiman, I., Lal, A.A., Gatti, S., Scaglia, M., Didier, E.S., Visvesvara, G.S., 2001a. Genotyping *Encephalitozoon hellem* isolates by analysis of the polar tube protein gene. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2191–2196.
- Xiao, L., Li, L., Visvesvara, G.S., Moura, H., Didier, E.S., Lal, A.A., 2001b. Genotyping *Encephalitozoon cuniculi* by multilocus analyses of genes with repetitive sequences. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2248–2253.
- Xiao, L., Li, L., Moura, H., Sulaiman, I.M., Lal, A.A., Gatti, S., Scaglia, M., Didier, E.S., Visvesvara, G.S., 2001c. Genotyping *Encephalitozoon* parasites using multilocus analyses of genes with repetitive sequences. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1 (Suppl.), 63S–65S.



Supplementary Fig. S1. Sequence diversity among *E. intestinalis* genotypes I and II with M2A (A), M3 (B), M5 (C) and M8 (D) genetic markers. Dots denote sequence identity and dashes denote nucleotide deletions. Asterisks indicate point changes respect to the correspondent unit marked with a horizontal slash.

4. DISCUSIÓN

4.1 Frecuencia de microsporidios, *C. cayetanensis* y *Cryptosporidium* spp. en aguas potables, residuales, superficiales y recreacionales y su variación estacional

En el presente estudio se muestran los primeros datos sobre la presencia de microsporidios, *Cryptosporidium* spp. y *C. cayetanensis* en aguas procedentes de diferentes estaciones de tratamiento de agua potable (ETAP), estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), aguas superficiales y aguas recreacionales de la zona centro de España. Se realizó el seguimiento de dichos parásitos durante un año para evaluar su comportamiento en las 4 estaciones meteorológicas y adicionalmente se determinó la presencia de los mismos tanto en el agua de entrada como tratada, con el fin de evaluar la efectividad de los tratamientos utilizados en la eliminación de estos microorganismos.

Los resultados obtenidos revelan un comportamiento similar en cuanto a la frecuencia de estos parásitos en las muestras de agua evaluadas, pues el mayor porcentaje de muestras positivas se encontró en las aguas procedentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales y en las aguas superficiales y recreacionales incluidas en el estudio. Los microsporidios y *C. cayetanensis* tuvieron frecuencias similares tanto en el agua de entrada como de salida de las depuradoras, lo cual puede sugerir que estos parásitos son capaces de sobrevivir a los tratamientos utilizados en dichas plantas y que estas pueden actuar como un vehículo de contaminación tanto de ríos como de aguas recreacionales en esta zona de España. La dificultad en cuanto a la eliminación de estos parásitos se relaciona con ciertas características que les confieren resistencia a condiciones ambientales y procedimientos químicos de desinfección, siendo una de las más importantes la presencia de una cubierta exterior gruesa tanto en las esporas de los microsporidios como en los ooquistes de los coccidios (Didier y Weiss 2006, Ortega y Sanchez 2010), y en el caso particular de los microsporidios, su diminuto tamaño, lo que les permite escapar a los sistemas de filtración comúnmente utilizados en los tratamientos tanto de aguas potables como residuales (Harrington y col. 2003).

Es importante resaltar que los resultados obtenidos con respecto a la presencia de estos parásitos en las ETAPs, reflejan una eficiencia en los métodos de desinfección y eliminación utilizados en las mismas, ya que el porcentaje de positividad encontrado fue más bajo comparado con el observado en las EDARs, y además, fue más frecuente encontrar los parásitos en el agua de entrada que en el agua tratada; incluso en el caso de *Cryptosporidium*, no se identificaron muestras positivas en las aguas tratadas procedentes de las ETAPs.

Los microsporidios estuvieron presentes durante todo el año, mostrando un pico de frecuencia en primavera y verano, con un alto porcentaje de muestras positivas tanto en el agua de entrada como de salida de las EDARs. Otros estudios también confirman la presencia de estos parásitos en aguas procedentes de depuradoras, lo que corrobora el potencial contaminante de dichas plantas (Dowd y col. 1998, Graczyk y col. 2007, Graczyk y col. 2007, Graczyk y col. 2009, Graczyk y col. 2009, Cheng y col. 2011). Con respecto a la variación estacional, nuestros resultados son similares a los obtenidos por Cheng y col. (Cheng y col. 2011), quienes evaluaron la presencia de microsporidios patógenos para el hombre en aguas residuales y encontraron un incremento en la frecuencia de estos parásitos en abril y julio, tanto en aguas tratadas como no tratadas. Sin embargo, en otros estudios realizados durante un año no se identificó ninguna tendencia (Fournier y col. 2000, Fournier y col. 2002, Coupe y col. 2006), aunque, hay que tener en cuenta que en estos estudios se analizó un número reducido de muestras y el tipo de agua evaluada fue diferente ya que solo se estudiaron aguas superficiales de ríos (Fournier y col. 2000, Coupe y col. 2006), piscinas (Fournier y col. 2002) y lagos (Coupe y col. 2006).

En cuanto a *C. cayetanensis*, su presencia en agua ya sea de consumo o aguas residuales también se ha confirmado en otras investigaciones, realizadas principalmente en países endémicos como Nepal y Perú (Madico y col. 1997, Sturbaum y col. 1998, Sherchand y col. 1999). Varios estudios evidencian el

papel de las aguas residuales como posible fuente de infección para este protozoo, relacionándolo con su uso en la irrigación de cultivos y diversas aplicaciones agrícolas, lo que a su vez favorece la contaminación de frutas y vegetales, entre otros cultivos, y facilita la transmisión del parásito (Mota y col. 2000, Vuong y col. 2007, Tram y col. 2008).

La relación entre la presencia de *C. cayetanensis* en muestras ambientales y las estaciones meteorológicas aún no se ha estudiado con profundidad, y aunque existen algunas investigaciones que han realizado el seguimiento de este coccidio durante un año (el-Karamany y col. 2005, Elshazly y col. 2007, Vuong y col. 2007, Tram y col. 2008), las muestras evaluadas incluían agua almacenada en tanques y destinada para el consumo (Elshazly y col. 2007); aguas procedentes de tuberías (el-Karamany y col. 2005); vegetales irrigados con aguas residuales, y lagos y ríos receptores de descargas de plantas depuradoras (Vuong y col. 2007, Tram y col. 2008). En dichos estudios la estacionalidad del parásito varió de acuerdo a la región estudiada, con un incremento en las épocas húmedas en Hanoi (Tram y col. 2008) y en los periodos de lluvia en Cambodia (Vuong y col. 2007).

De acuerdo a lo anterior y hasta donde tenemos conocimiento, nuestros resultados son los primeros datos sobre la frecuencia de este coccidio durante un año en aguas de ETAPs y EDARs (tanto en el agua de entrada como tratada), no solo en España sino a nivel mundial. Se encontró una clara estacionalidad del parásito, encontrándose una frecuencia más alta en primavera (abril a junio). Sin embargo, una limitación con respecto a la interpretación de estos resultados, es la ausencia de datos sobre los casos de ciclosporiasis en pacientes durante el periodo en el que se realizó la investigación, lo que dificulta el establecimiento de una correlación entre el patrón de infección por *Cyclospora* spp. y la variación estacional ya descrita.

En España la información con respecto a la presencia de *C. cayetanensis* proviene de casos esporádicos o brotes epidémicos (Gascon y col. 2001, Puente

y col. 2006, Ramirez-Olivencia y col. 2008), y hasta el momento, no existen estudios que describan una estacionalidad del parásito en muestras clínicas. Adicionalmente sería interesante determinar que otras especies de *Cyclospora* pueden estar presentes en las muestras ambientales como también investigar la presencia de *C. cayetanensis* en animales que podrían actuar como reservorios de este parásito. En varios estudios se ha descrito la presencia de ooquistes compatibles con *Cyclospora* en la materia fecal de animales incluyendo perros, gallinas, patos y primates, (Zerpa y col. 1995, Garcia-Lopez y col. 1996, Chu y col. 2004, Li y col. 2007, Cordon y col. 2009). En España, Cordon y col. (Cordon y col. 2009) determinaron un 4,5% de positividad para *Cyclospora* spp. en muestras fecales de pájaros, y aunque en estos estudios no se confirmó la especie, los resultados muestran que este coccidio podría ser más frecuente de lo inicialmente establecido y que animales diferentes al hombre podrían jugar un papel en su transmisión.

En este estudio también se presentan los primeros datos de *Cryptosporidium* spp. en aguas potables, residuales y recreacionales de la zona centro de España durante un año de seguimiento. En este caso se evaluaron puntos de muestreo diferentes a los incluidos en el estudio de microsporidios y *Cyclospora*. De manera similar a lo ocurrido con estos parásitos, la distribución de las muestras positivas para *Cryptosporidium* spp. reveló una mayor frecuencia del mismo en las aguas procedentes de las EDARs seguidas por las aguas recreacionales (piscinas naturales). Al contrario de lo que sucede con los microsporidios y *Cyclospora*, en España, hay varios estudios sobre la presencia de *Cryptosporidium* spp. en diferentes tipos de agua. Nuestros resultados reflejan una menor frecuencia de este protozoo cuando se compara con lo descrito en otras regiones del país, incluyendo Galicia, Cataluña y País Vasco (Montemayor y col. 2005, Carmena y col. 2007, Guzman y col. 2007, Castro-Hermida y col. 2008, 2008, Castro-Hermida y col. 2009, Castro-Hermida y col. 2010, Castro-Hermida y col. 2011) y en otros países desarrollados como el Reino Unido (Smith y Nichols 2010).

En las ETAPs, *Cryptosporidium* solo se encontró en el agua de entrada, y mediante inmunofluorescencia se detectó menos de un ooquiste por 10 litros de agua, lo que constituye el valor aceptado por la única norma de calidad del agua potable que incluye *Cryptosporidium* spp. en Europa (DWI 2000). De lo anterior se concluye que el agua tratada procedente de las ETAPs evaluadas es adecuada y no debe considerarse como fuente de infección para este parásito en España. Los datos encontrados en las regiones ya mencionadas, documentan frecuencias del parásito más altas con un mayor número de ooquistes por litro (Montemayor y col. 2005, Carmena y col. 2007, Guzman y col. 2007, Castro-Hermida y col. 2008, 2008, Castro-Hermida y col. 2009, Castro-Hermida y col. 2010, Castro-Hermida y col. 2011). La variación en estos valores se relacionó con el tipo de tratamiento utilizado en la ETAP, describiéndose una elevada presencia del parásito en las aguas tratadas en ETAPs con instalaciones pequeñas; y también con un predominio de la actividad ganadera en las regiones estudiadas. A nivel mundial se describen datos de frecuencia de *Cryptosporidium* spp. en aguas no tratadas de ETAPs normalmente mayores a los encontrados en nuestro estudio, con rangos entre un 10 a 100%. Sin embargo, también se ha documentado una reducción significativa en la presencia del parásito en las aguas tratadas (Lobo y col. 2009, Moulin y col. 2010, Nichols y col. 2010).

En cuanto a la presencia de *Cryptosporidium* spp. en las muestras de agua de las EDARs evaluadas en nuestro estudio, es importante resaltar que se observaron frecuencias menores en el agua tratada comparada con el agua de entrada, y aún más notable, la baja frecuencia encontrada en las aguas sometidas a tratamiento terciario (solo 2 de 13 muestras fueron positivas). Los estudios sobre la presencia de *Cryptosporidium* spp. realizados en aguas residuales de plantas de tratamiento de Galicia, Cataluña y País Vasco y de otros países desarrollados, describen una alta prevalencia de este parásito; la mayoría de los cuales demuestran la ineficiencia en la eliminación de este coccidio en las aguas sometidas sólo a un tratamiento secundario (Montemayor y col. 2005, Gomez-Couso y col. 2006, Castro-Hermida y col. 2009, Castro-

Hermida y col. 2010, Castro-Hermida y col. 2011) e incluso en aguas regeneradas o procesadas con tratamientos terciarios (Gennaccaro y col. 2003, Levantesi y col. 2010).

En España, hasta la fecha solo hay tres estudios publicados sobre la presencia de *Cryptosporidium* spp. en aguas terciarias de EDARs (Montemayor y col. 2005, Rodríguez-Manzano y col. 2012, Rubiano y col. 2012). Montemayor y col. (Montemayor y col. 2005) encontraron que un 75% de las aguas regeneradas eran positivas para el parásito, sin embargo detectaron un número reducido de ooquistes por litro (0,09-0,63). Rodríguez-Manzano y col. (Rodríguez-Manzano y col. 2012) identificaron ooquistes viables de *Cryptosporidium* en aguas sometidas a tratamiento terciario en la región este de España. Rubiano y col. (Rubiano y col. 2012) estudiaron el impacto de la descarga de aguas regeneradas sobre los niveles de diferentes patógenos, incluyendo *Cryptosporidium* spp., en el río Llobregat (Barcelona) y encontraron que estas aguas una vez eran tratadas con radiación ultravioleta o cloración, no contenían ooquistes infectantes por encima de los límites de detección. Los tratamientos terciarios utilizados en las EDARs evaluadas en este estudio incluyen ambos procedimientos, y aunque mediante PCR se identificaron 2 muestras positivas para *Cryptosporidium* spp., en ambos casos la concentración de ADN fue muy baja y la presencia del parásito no se pudo confirmar por inmunofluorescencia. Estos resultados sugieren una mejora en la calidad del agua que sale de las EDARs después de un tratamiento terciario, considerándose apropiada para su uso y sin un impacto negativo sobre la salud pública.

Con respecto a la presencia de *Cryptosporidium* spp. en aguas recreacionales, los datos encontrados en la literatura son variables. Las frecuencias encontradas en las piscinas naturales evaluadas en este estudio son menores a las descritas en Galicia, Cataluña y País Vasco (Montemayor y col. 2005, Carmena y col. 2007, Castro-Hermida y col. 2009, Castro-Hermida y col. 2010) y algunos países desarrollados como Australia (Loganthan y col. 2012). Estos resultados pueden deberse entre otros factores a que la actividad ganadera en

la zona de la comunidad de Madrid evaluada no es tan importante como la descrita en las otras regiones de España, en donde documentan frecuencias más altas para este parásito; y adicionalmente, a que no se encuentran plantas depuradoras en los alrededores de estas piscinas naturales, que puedan actuar como fuentes de contaminación de *Cryptosporidium* spp.

En cuanto a la variación estacional de *Cryptosporidium* spp., aunque este parásito se encontró durante todo el año de seguimiento, la frecuencia más alta se observó en invierno, seguido por verano y primavera. Los resultados obtenidos en otros estudios son variables (Hashimoto y col. 2001, Carmena y col. 2007, Castro-Hermida y col. 2010), por lo que aún no se ha definido si en realidad existe una estacionalidad para este protozoo. En España, por ejemplo, se han descrito picos del parásito durante la primavera y el otoño en aguas residuales (crudas y tratadas) y ríos en el nordeste (Montemayor y col. 2005); durante el otoño y el verano en aguas potables en el norte (Carmena y col. 2007); y durante la primavera y el verano, en aguas potables, residuales, recreacionales y superficiales de Galicia (Castro-Hermida y col. 2008, 2008, Castro-Hermida y col. 2009, Castro-Hermida y col. 2010). La estacionalidad de *Cryptosporidium* spp. depende de los picos de incidencia que dicho protozoo presente tanto en humanos como animales. En Europa, se observó una alta incidencia del parásito en el otoño de 2005, con el 59% de los casos descritos entre agosto y noviembre, sin embargo cuando nos ubicamos en países específicos, los datos son variables, encontrándose picos en primavera en Irlanda y en verano en España (Semenza y Nichols 2007). Desafortunadamente, no se conocen datos publicados sobre la prevalencia del parásito en humanos o animales en la zona evaluada, por lo que no se pudo inferir una asociación entre esta variable y la estacionalidad observada en nuestro estudio.

Las precipitaciones y las temperaturas bajas son otros factores que se encuentran asociados con el aumento en las concentraciones de *Cryptosporidium* spp. en el agua, los cuales pueden influir en el vertimiento y

supervivencia de los ooquistes en aguas superficiales (Bodley-Tickell y col. 2002). Sin embargo los datos publicados al respecto no son concluyentes (Robertson y Gjerde 2001, Bodley-Tickell y col. 2002, Carmena y col. 2007, Helmi y col. 2011, Robinson y col. 2011), y en nuestro estudio no se encontró una relación directa entre la presencia de *Cryptosporidium* spp. y las precipitaciones observadas durante el periodo de investigación.

Es importante tener en cuenta que, aunque las ETAPS y EDARs estudiadas cumplen con la normativa europea y nacional sobre la calidad del agua, la presencia tanto de coccidios intestinales como de microsporidios (los cuales no están incluidos en dichas normas) en las muestras de agua de estas plantas, sugiere la necesidad de realizar estudios que contribuyan en el conocimiento sobre la distribución y supervivencia de estos parásitos en muestras ambientales, de tal manera que pueda establecerse su verdadero potencial como patógenos emergentes transmitidos por el agua. Así mismo, plantea la necesidad de actualizar el listado de patógenos de origen parasitario que deben ser controlados en las aguas destinadas al consumo humano en nuestro país.

Adicionalmente, hay que resaltar la utilidad del sistema IDEXX Filta-Max en la recuperación tanto de esporas de microsporidios como de ooquistes de *Cyclospora* en las muestras de agua evaluadas, lo cual a su vez influiría en la disminución de los tiempos y costos relacionados con la detección de patógenos en estas muestras, ya que dicho sistema se podría aplicar en la investigación simultánea no solo de *Cryptosporidium* y *Giardia* (para el cual fue estandarizado y validado), sino también de otros microorganismos. En el trabajo realizado por Magnet y col. (Magnet y col. 2012), se demuestra además, la utilidad de esta técnica en la búsqueda de *Acanthamoeba* spp. en aguas de la zona centro de España, encontrando porcentajes de positividad entre un 90 a 100%.

En la literatura hay una gran variedad de métodos de recolección y concentración de microsporidios (Sparfel y col. 1997, Dowd y col. 1998, Fournier y col. 2000, Thurston-Enriquez y col. 2002, Graczyk y col. 2007,

Graczyk y col. 2007) y *Cyclospora* (Dowd y col. 2003, el-Karamany y col. 2005, Elshazly y col. 2007, Vuong y col. 2007, Tram y col. 2008) en aguas, los cuales difieren no solo en el volumen de muestra, sino también en los métodos de filtración, elución, entre otros, lo cual no permite la comparación de resultados y por lo tanto hace difícil la selección del método más apropiado. Este es el primer estudio que utiliza el sistema IDEXX Filta Max para la recolección y concentración de *Cyclospora* spp. en diferentes tipos de agua. En el caso de los microsporidios, solo hay un trabajo previo, realizado por Izquierdo y col. (Izquierdo y col. 2011), quienes emplearon dicho sistema en el estudio de la presencia de estos parásitos en aguas potables, residuales y recreacionales de Galicia. Estos autores encontraron un 20,1% de muestras positivas para microsporidios, resultado que sugiere la utilidad de esta técnica.

De acuerdo a lo anterior y teniendo en cuenta que hasta el momento no existe una metodología estandarizada y validada para la detección tanto de microsporidios como de *Cyclospora* en muestras de agua, el método IDEXX Filta Max puede considerarse como una alternativa valiosa para la búsqueda de estos microorganismos.

4.2 Distribución de especies de microsporidios, *Cyclospora* spp. y *Cryptosporidium* spp. en muestras ambientales

Al evaluar las especies de los parásitos incluidos en este estudio se observa que la mayoría de estas son patógenas para los humanos, lo que confirma el papel del agua como fuente de infección de microorganismos de importancia para la salud pública. *C. cayetanensis* fue la única especie de *Cyclospora* que se confirmó en este estudio, lo cual implica en primer lugar que los humanos son la principal fuente de contaminación de las aguas evaluadas, ya que hasta el momento son los únicos hospedadores descritos para esta especie, y adicionalmente, sugiere que la posibilidad de una transmisión hídrica de este parásito en España es posible.

En el caso de los microsporidios, *E. intestinalis* y *E. bieneusi* fueron las especies más frecuentes en las muestras de agua analizadas en nuestro estudio. Esta alta frecuencia se puede explicar en primer lugar, porque son las especies más patógenas y prevalentes en humanos y además se han descrito en una amplia variedad de hospedadores que incluyen mamíferos domésticos y silvestres (Mathis y col. 2005) y aves (Haro y col. 2005, Mathis y col. 2005, Haro y col. 2006, Slodkiewicz-Kowalska y col. 2006, Bart y col. 2008, Kasickova y col. 2009). Los datos encontrados en nuestro estudio sobre la frecuencia de microsporidios en animales de diferentes regiones de España, confirman la amplia distribución de ambas especies, ya que fueron las únicas especies detectadas en los animales domésticos y de granja (perros, gatos, conejos, cerdos y avestruces), y silvestres (zorros) evaluados, siendo *E. bieneusi* la especie más prevalente.

Varios estudios sugieren que estos animales pueden actuar como reservorios, facilitando la transmisión del parásito mediante la contaminación ambiental. Sulaiman y col. (Sulaiman y col. 2003) detectaron esporas de *E. bieneusi* en mamíferos silvestres asociados con aguas superficiales, por lo que señalaron a dichos animales como fuente potencial de contaminación con esporas del parásito. Slodkiewicz-Kowalska y col. (Slodkiewicz-Kowalska y col. 2006) demostraron que las aves acuáticas podían contaminar aguas superficiales con esporas de microsporidios asociadas con infección en humanos y Graczyk y col. (Graczyk y col. 2007), demostraron que el agua contaminada con heces de palomas era una fuente potencial de esporas de *E. bieneusi* para el humano. Otros estudios han detectado esporas de ambas especies en diferentes tipos de aguas. Sparfel y col. en 1997 (Sparfel y col. 1997) confirmaron la presencia de esporas de *E. bieneusi* en el río Sena. Dowd y col. (Dowd y col. 1998), además de *E. bieneusi*, también detectaron esporas de *E. intestinalis* y *V. corneae* en aguas superficiales, subterráneas y aguas residuales procedentes de efluentes terciarios, sugiriendo la ineficiencia de los tratamientos utilizados para la eliminación de estos parásitos. Posteriormente, estos mismos autores,

identificaron esporas de *E. intestinalis* en aguas destinadas para el consumo humano (Dowd y col. 2003).

Es importante resaltar el hallazgo de esporas de *E. cuniculi* y *A. algerae* en las muestras de agua incluidas en el estudio y señalar que hasta el momento no se conocen datos sobre la presencia de *E. cuniculi* en muestras ambientales, por lo que esta constituiría la primera cita en muestras de agua. Este parásito mostró una clara tendencia estacional, ya que solo se identificaron muestras positivas durante el invierno. Con respecto a *A. algerae*, solo hay un estudio que documenta su presencia en aguas estancadas (Avery y Undeen 1987). En nuestro estudio, se describe por primera vez la presencia de esporas de esta especie en aguas superficiales. El hallazgo de ambas especies en este tipo de muestras es importante, ya que aunque están más frecuentemente asociadas con infecciones en otros mamíferos en el caso de *E. cuniculi* (Didier y Weiss 2006), y de insectos en *A. algerae* (Visvesvara y col. 2005), también se consideran como patógenos de humanos. *E. cuniculi* está asociado con infecciones respiratorias, oculares, del tracto urinario, hepáticas, del sistema nervioso central y diseminadas, y ocasionalmente intestinales (Didier y Weiss 2006) mientras que *A. algerae* puede ocasionar infecciones oculares y musculares (Visvesvara y col. 2005, Didier y Weiss 2006).

El alto porcentaje de muestras en las que no se pudo identificar la especie de microsporidio no es sorprendente, ya que es común la presencia en el ambiente, específicamente el agua, de otros géneros que no están asociados con enfermedades en el hombre pero que si afectan peces y numerosos invertebrados que incluyen insectos (Didier y Weiss 2006). Aunque en nuestro estudio, no se pudo confirmar la especie de microsporidio mediante análisis de secuencia del producto de PCR de *phylum*, si se establecieron homologías menores del 95% con microsporidios de insectos, lo que corrobora la posible contaminación de las aguas evaluadas con especies de invertebrados.

Con respecto a *Cryptosporidium*, *C. hominis* fue la especie más frecuente en las muestras analizadas, encontrándose únicamente en las aguas procedentes de las EDARs, lo que sugiere que los humanos podrían ser las principales fuentes de contaminación para este protozoo. Las otras especies identificadas incluyen en orden de frecuencia *C. muris*, *C. andersoni*, *C. parvum* y *C. ubiquitum*, y aunque la mayoría de estas especies no se consideran como patógenos comunes de humanos, su presencia en las aguas evaluadas no debe ser subestimada, ya que ocasionalmente pueden causar infección, especialmente en niños y pacientes inmunosuprimidos (Xiao 2010).

La baja frecuencia de *C. parvum* puede deberse en gran medida a que esta especie es más prevalente en áreas rurales en las que predomina la actividad ganadera (Llorente y col. 2007, Castro-Hermida y col. 2008, Castro-Hermida y col. 2009, Castro-Hermida y col. 2010). En España, tanto *C. hominis* como *C. parvum*, son las especies más comúnmente asociadas con infecciones en humanos (Navarro-i-Martinez y col. 2011). Los datos sobre cuál de las dos especies es más frecuente en el país son variables, algunos estudios demuestran una mayor prevalencia de *C. hominis* frente a *C. parvum*, mientras que otros han encontrado un predominio de esta última en humanos (Navarro-i-Martinez y col. 2011, Martín-Ampudia y col. 2012). Ambas especies se han identificado en muestras de aguas de diferentes regiones de España (Castro-Hermida y col. 2008, Castro-Hermida y col. 2009, Castro-Hermida y col. 2011) y en numerosos estudios realizados en diferentes países (Baldursson y Karanis 2011).

Cryptosporidium muris fue la segunda especie más frecuente en nuestro estudio, detectándose en las aguas procedentes de ETAPs, EDARs y piscinas naturales. En España, esta especie se ha identificado en animales incluyendo roedores en el nordeste (Torres y col. 2000) y reptiles en Madrid (Pedraza-Díaz y col. 2009), como también en aguas tratadas de EDARs de Galicia (Gómez-Couso y col. 2006). Su presencia en aguas también se ha confirmado en otros estudios a nivel mundial (Peng y col. 2003, Feng y col. 2009, Lobo y col. 2009).

Cryptosporidium andersoni fue otra de las especies identificadas, sin embargo se detectó únicamente en las piscinas naturales, y es probable que el ganado adulto sea una de las fuentes de contaminación, ya que son los hospedadores naturales para esta especie. Al igual que las otras especies de *Cryptosporidium*, varios estudios han confirmado la presencia de *C. andersoni* en diferentes tipos de aguas, tanto en España (Castro-Hermida y col. 2008, 2008, Castro-Hermida y col. 2009, Castro-Hermida y col. 2011) como en otros países (Yang y col. 2008, Lobo y col. 2009, Nichols y col. 2010, Liu y col. 2011).

Esta es la primera descripción de *C. ubiquitum* (conocido anteriormente como genotipo de cerdos) en muestras de agua en España; este hallazgo no es sorprendente, teniendo en cuenta que esta especie se ha descrito en una amplia variedad de animales, tanto domésticos (Díaz y col. 2010, Shen y col. 2011) como silvestres (Robinson y col. 2011) que pueden actuar como fuentes de contaminación. En España se ha documentado su presencia en corderos (Díaz y col. 2010) e incluso en humanos, en un niño de 6 años de edad (Cieloszyk y col. 2012). Adicionalmente existen datos a nivel mundial que confirman la presencia de *C. ubiquitum* en agua potable (Nichols y col. 2010) y aguas residuales (Liu y col. 2011, Van Dyke y col. 2012).

4.3 Diversidad genética de microsporidios y *Cryptosporidium* spp. en aguas potables, residuales y recreacionales de la zona dentro de España

El análisis de la diversidad genética de los parásitos evaluados se realizó con el fin de aportar datos sobre la epidemiología molecular de dichos parásitos, información que a su vez puede ser de utilidad en la formulación e implementación de estrategias adecuadas de prevención y control. Para la caracterización molecular de diferentes especies de microsporidios se realizó el análisis de secuencias polimórficas útiles en la identificación de genotipos y que ya se han descrito en la literatura, incluyendo la región ITS en el caso de *E. bienersi* y el gen de la PTP para *E. cuniculi*. Además se aplicaron nuevos marcadores con potencial discriminatorio en el estudio de la variabilidad de *E.*

intestinalis. En cuanto a *Cryptosporidium*, se realizó el estudio de los subtipos de *C. hominis* y *C. parvum* detectados en las muestras de agua, mediante el análisis de secuencia del gen de la proteína GP60.

Una característica común encontrada en los parásitos evaluados fue su baja diversidad genética, particularmente para *E. bienewsi* y *C. hominis*, para los que se ha descrito una gran variabilidad genotípica (Santin y Fayer 2009, Xiao 2010). En el caso de *E. bienewsi* solo se identificaron 3 genotipos (D-*like*, D y C) y en *C. hominis* se determinó la presencia de los subtipos IbA10G2 e IaA11G3T3. A pesar de la baja diversidad, el análisis de la información obtenida a partir de la identificación de estos genotipos y subtipos, sugiere que su elevada frecuencia en las muestras de agua evaluadas puede deberse a la contaminación de las mismas no solo por humanos sino también por una amplia gama de animales que se han descrito como hospedadores de estos genotipos.

De acuerdo a la clasificación basada en el análisis filogenético de las secuencias de la región ITS, los genotipos D-*like*, D y C de *E. bienewsi* se encuentran en el grupo 1 de los genotipos descritos para este microsporidio (Thellier y Breton 2008, Santin y Fayer 2009, Henriques-Gil y col. 2010). Este grupo es el más diverso de los cinco que se han documentado, con un gran número de genotipos aislados de humanos (tanto VIH positivos como negativos) y animales domésticos y silvestres (Thellier y Breton 2008, Santin y Fayer 2009). El genotipo D-*like* fue el más frecuente en las muestras ambientales analizadas, y hasta el momento solo se ha descrito en América del sur (Santin y col. 2006), sin datos publicados sobre su presencia en Europa, siendo esta la primera descripción. Es importante señalar que aunque hasta el momento solo se han identificado los gatos como reservorios de este genotipo (Santin y col. 2006), no se debe subestimar la importancia que pueda tener como agente de infecciones en humanos, teniendo en cuenta que solo hay un estudio sobre la caracterización molecular de *E. bienewsi* en España (Galvan y col. 2011).

El genotipo D tiene una amplia distribución geográfica, habiéndose descrito en América, Asia, África y Europa (Thellier y Breton 2008, Santin y Fayer 2009, Henriques-Gil y col. 2010). Se ha encontrado en animales que incluyen cerdos, ganado, zorros, macacos y perros, entre otros (Thellier y Breton 2008); y en humanos es común en pacientes VIH positivos (Rinder y col. 1998, Sadler y col. 2002, Sulaiman y col. 2003, Leelayoova y col. 2006, Breton y col. 2007), aunque también se ha documentado en personas seronegativas (Breton y col. 2007).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre la identificación y caracterización molecular de microsporidios en pacientes trasplantados, revelan la presencia de este genotipo en 2 de dichos pacientes (Galvan y col. 2011). Con respecto al genotipo C, hasta el momento, este solo se ha descrito en humanos con restricción geográfica en Europa (Rinder y col. 1997, Breitenmoser y col. 1999, Dengjel y col. 2001), particularmente en pacientes trasplantados, sin embargo en España no hay datos sobre su presencia en muestras clínicas o ambientales, siendo esta la primera descripción de este genotipo en aguas.

Con respecto a *E. cuniculi*, no existe una gran variabilidad, ya que mediante el análisis de diferentes marcadores como la región ITS, el gen de la PTP y el gen de la SWP1, solo se han descrito 4 genotipos para esta especie. En nuestro estudio se identificaron los genotipos I (cepa de conejo) y III (cepa de perro) en muestras de aguas residuales y superficiales. Estos genotipos se han documentado ampliamente en humanos y animales en Europa (Rossi y col. 1998, del Aguila y col. 2001, Tosoni y col. 2002, Reetz y col. 2009). Al igual que *E. bienensis*, los estudios de variabilidad de *E. cuniculi* en España son escasos, solo hay un estudio realizado por Del Aguila y col. (del Aguila y col. 2001), en el que se identificó el genotipo III en la orina y esputo de un paciente con sida.

En cuanto a la diversidad genética de *C. hominis*, solo se identificaron subtipos pertenecientes a las familias alélicas Ia (IbA10G2) e Ie (IeA11G3T3). El subtipo

IbA10G2 se ha descrito ampliamente a nivel mundial (exceptuando América del sur) (Jex y Gasser 2010), y es el principal subtipo asociado con brotes de criptosporidiosis transmitidos por el agua (Alves y col. 2003, Peng y col. 2003, Zhou y col. 2003, Jex y Gasser 2010), por lo que nuestros hallazgos son similares a los encontrados por otros autores, confirmando la alta frecuencia de este subtipo en muestras ambientales. Adicionalmente se confirma el patrón de distribución de los subtipos de *C. hominis*, siendo habitual la presencia de una población homogénea de subtipos en países desarrollados, con predominio de la familia Ib. Por el contrario, en países en desarrollo se observan múltiples familias alélicas y varios subtipos dentro de estas familias (Jex y Gasser 2010, Xiao 2010). Esta es la primera descripción del subtipo IeA11G3T3 en aguas, no solo en España si no en el ámbito mundial; hasta el momento solo hay una publicación sobre la presencia de la familia alelica Ie en aguas residuales en la China, pero el subtipo identificado fue el IeA12G3T3 (Feng y col. 2009). El alelo IeA11G3T3 es el más común dentro de la familia Ie (Jex y Gasser 2010), y también se ha asociado con infecciones en humanos, aunque por lo general de carácter asintomático (Cama y col. 2007).

4.4 Distribución de especies y diversidad genética de microsporidios en animales domésticos, de granja y silvestres de España

Los datos obtenidos a partir del estudio de 159 muestras de animales domésticos y de granja (perros, gatos, conejos, cerdos y avestruces), y silvestres (zorros) de varias regiones de España, revelan una alta frecuencia de microsporidios (53% y 28% mediante la tinción de Weber y PCR respectivamente), máxime si se tiene en cuenta que las muestras analizadas no presentaban evidencias de sintomatología intestinal. *E. bieneusi* (83%) y *E. intestinalis* (17%) fueron las únicas especies identificadas, lo cual coincide con lo publicado en la literatura.

A pesar de la menor frecuencia de *E. intestinalis*, estos datos permiten confirmar su presencia en animales domésticos como gatos y cerdos, y contribuir al conocimiento actual del rango de animales que pueden actuar

como hospedadores para este parásito, indicando un mayor número de fuentes potenciales de infección para los humanos. También es importante destacar la presencia tanto de *E. bieneusi* como de *E. intestinalis* en avestruces, lo cual se constituye en el primer diagnóstico de estas especies en dichos animales, en los cuales solo se había descrito la infección por *E. hellem* (Gray y col. 1998, Snowden y Logan 1999).

La caracterización molecular de las muestras positivas para *E. bieneusi* reveló la presencia de 4 genotipos. El genotipo A, el cual se detectó en perros de la comunidad de Madrid y aunque ya se había documentado su presencia en aves (Kasickova y col. 2009), era considerado como un genotipo específico de humanos. Este estudio es el primero en documentar dicho genotipo en animales domésticos, particularmente en perros y además sugiere que no solo los humanos sino también los animales pueden participar en su transmisión. El genotipo D se identificó en conejos y zorros, lo que confirma la amplia gama de hospedadores animales de este genotipo y sustenta su alta frecuencia en humanos. Los genotipos I y tipo IV se detectaron en cerdos y avestruces, respectivamente. Es importante señalar que muchos de los datos aportados por este trabajo son, hasta donde tenemos conocimiento, las primeras descripciones de la presencia de ciertos genotipos en los animales evaluados, e incluso es la primera vez que se realiza la caracterización genotípica de *E. bieneusi* en algunos de ellos (conejos y avestruces).

Todos estos datos reflejan en primer lugar la amplia variedad de hospedadores animales y por ende el gran potencial zoonótico de *E. bieneusi*; la presencia de genotipos en animales que están en estrecho contacto con los humanos, como perros y cerdos en España, lo que facilita su transmisión; y finalmente que tanto los humanos como los animales pueden actuar como fuentes de contaminación de las aguas de consumo, residuales y recreacionales. Estos resultados deben considerarse para el establecimiento de medidas de prevención que contribuyan a reducir la transmisión de *E. bieneusi*, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (pacientes VIH/sida y

trasplantados) y personas en mayor riesgo de adquirir este parásito, como niños y ancianos.

4.5 Caracterización molecular de aislados de *E. bienewsi* procedentes de pacientes trasplantados de España

La microsporidiosis se ha asociado principalmente con pacientes VIH/sida, sin embargo, es importante resaltar que aunque dicha población sigue siendo el blanco principal de estos microorganismos, esta parasitosis también se ha descrito en personas con otro tipo de inmunocompromiso, incluyendo los pacientes trasplantados sometidos a terapia inmunosupresora.

En este estudio se realizó la identificación y caracterización molecular de microsporidios en dos pacientes trasplantados con sintomatología intestinal, siendo esta la primera descripción en España. Mediante tinción tricómica se detectó la presencia de esporas de microsporidios y por PCR se identificó a *E. bienewsi* en la materia fecal de ambos pacientes, hallazgo que concuerda con lo descrito en otras publicaciones, en las que esta especie es la más frecuentemente asociada con este tipo de pacientes, seguida por *E. cuniculi* (Rabodonirina y col. 2003, Lanternier y col. 2009). Aunque en ambos pacientes se encontraron otros patógenos (Citomegalovirus y *Clostridium difficile*) en la materia fecal, la sintomatología presentada y el tratamiento con fármacos útiles en el control de los mismos, sugirió a *E. bienewsi* como agente causal de la diarrea descrita.

El análisis de la secuencia de la región ITS reveló la presencia del genotipo D en ambos pacientes, este genotipo tiene un amplio rango de hospedadores, lo que facilita su transmisión y además se ha encontrado en todos los continentes. La información sobre los datos epidemiológicos moleculares de *E. bienewsi* en pacientes trasplantados es escasa, ya que la mayoría de los estudios solo identifican la especie de microsporidio. Varios autores describen el predominio del genotipo C en esta población (Liguory y col. 2001, Sing y col. 2001, ten Hove y col. 2009). Liguory y co. (Liguory y col. 2001), encontraron el genotipo

C en 7 de 8 pacientes trasplantados, mientras que solo uno presentó el genotipo D. Sing y col. (Sing y col. 2001) también encontraron el genotipo C en un receptor de un trasplante de hígado, y ten Hove y col. (ten Hove y col. 2009), mediante el estudio de la diversidad genética de este parásito en personas inmunocompetentes e inmunocomprometidas de Malawi y los Países Bajos, detectaron la presencia del genotipo C únicamente en pacientes trasplantados.

Hay que destacar que tanto el genotipo D como el genotipo C, se encontraron en las muestras ambientales incluidas en el análisis de aguas de la zona centro de España; y además, también se ha confirmado la presencia del genotipo D en animales domésticos y silvestres de varias regiones del país. Aunque son datos procedentes del análisis de un número reducido de muestras y con cierta restricción geográfica, aportan información novedosa sobre la distribución de genotipos de este microsporidio en España.

Finalmente, con este estudio se confirma que los pacientes trasplantados deben considerarse como un grupo de riesgo para la adquisición de la microsporidiosis, y que estos parásitos se deben tener en cuenta en los casos de diarrea persistente y también en el diagnóstico diferencial de otros síndromes, como la fiebre crónica de etiología desconocida, una vez las causas más comunes sean descartadas. Además de la identificación de la especie de microsporidio, es ideal realizar estudios de caracterización molecular de los parásitos aislados, con el fin de identificar las posibles fuentes de infección, reservorios y otras características epidemiológicas que contribuyan al control y prevención de los mismos.

4.6 Estudio de la variabilidad de cepas de *E. intestinalis* mediante la aplicación de nuevos marcadores genotípicos

La caracterización genotípica de microsporidios es una herramienta útil en el entendimiento de aspectos básicos de estos parásitos, incluyendo su transmisión y epidemiología. Hasta la fecha se han realizado varios estudios

sobre la variación genética de microsporidios patógenos para el hombre, incluyendo *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. bienewisi* y *E. intestinalis*, utilizando marcadores como la región espaciadora ITS y los genes de la PTP1 y SWP1 (Didier y col. 1995, del Aguila y col. 1998, Mathis y col. 1999, Sobottka y col. 1999, Liguory y col. 2000, del Aguila y col. 2001, del Aguila y col. 2001, Xiao y col. 2001, Xiao y col. 2001, Xiao y col. 2001, Furuya 2002, Haro y col. 2003, Haro y col. 2006).

Teniendo en cuenta que *E. intestinalis* es la segunda especie de microsporidios más frecuente en humanos; que también se ha demostrado su presencia tanto en animales como en muestras ambientales y que hasta el momento no se había descrito una variabilidad genética en diferentes aislados de este parásito, se realizó la búsqueda de marcadores polimórficos utilizando la secuencia del genoma de este microsporidio. Se establecieron 8 *loci* (M2, M2A, M3, M5, M7, M7A, M8 y PTP1) con potencial discriminatorio, los cuales se utilizaron en el estudio de 9 cepas del parásito procedentes del norte y sur de América y Europa.

Tres de los 8 marcadores genotípicos (M2, M7 y PTP1) presentaron secuencias idénticas entre las cepas evaluadas. En el caso del gen PTP1, nuestros resultados concuerdan con lo publicado por Xiao y col. (Xiao y col. 2001), quienes no encontraron variabilidad en este locus en 11 aislados de *E. intestinalis*. Otros estudios basados en análisis antigénicos y moleculares, también describen la homogeneidad entre aislados de esta especie de microsporidio (Doultree y col. 1995, Didier y col. 1996, del Aguila y col. 1998, Liguory y col. 2000, Fedorko y col. 2001, Graczyk y col. 2002, Valencakova y col. 2012).

Cuatro marcadores (M2A, M3, M7A y M8) fueron idénticos en 8 de las 9 cepas analizadas; siendo la única diferente, la secuencia de referencia publicada en GenBank (ATCC 50506), incluso al compararla con la cepa ATCC 50506 que se utilizó en nuestro estudio. Una posible explicación a este hecho, es que en lugar

de existir una verdadera variabilidad genética, las diferencias observadas entre las secuencias de las cepas incluidas en nuestro estudio y las publicadas en GenBank, puedan deberse a errores de secuenciación del genoma de *E. intestinalis*. Sin embargo, esto es poco probable, ya que las diferencias entre los alelos parecen seguir un patrón y están lejos de ser un producto del azar. La explicación más plausible es que aunque la cepa ATCC 50506 evaluada en nuestro laboratorio y la utilizada en el proyecto genoma de *E. intestinalis*, están catalogadas bajo el mismo nombre, en realidad corresponden a diferentes subcepas de este microsporidio. Sin duda, el análisis del material utilizado originalmente para la secuenciación del genoma completo debería resolver esta duda, pero desafortunadamente, ya no está disponible, o al menos nosotros no hemos sido capaces de obtenerlo.

El hallazgo más notable de este estudio es que por primera vez se demuestra la existencia de variabilidad en *E. intestinalis*. El análisis de las secuencias obtenidas con el marcador M5, permitió la definición de 2 genotipos entre las cepas estudiadas, demostrando ser un marcador valioso para el estudio de la diversidad de *E. intestinalis*. Teniendo en cuenta estos resultados este marcador se utilizó en el análisis de muestras ambientales y de animales que fueron positivos para *E. intestinalis*. Desafortunadamente no se pudo obtener un producto amplificado de dichos marcadores en ninguna de las muestras evaluadas, lo cual pudo deberse a que la cantidad de ADN del parásito en dichas muestras era muy baja, o a que las secuencias analizadas corresponden a regiones codificantes de copia única en el genoma del parásito, lo que disminuye la sensibilidad de los métodos de detección. A pesar de estos resultados, la identificación de este marcador es prometedora, ya que al ser utilizado en diferentes muestras ya sea clínicas o ambientales, permitiría la clasificación genotípica de los aislados encontrados y también el establecimiento de asociaciones hipotéticas con ciertas características del parásito como su capacidad infectiva, distribución geográfica, resistencia a fármacos y sintomatología ocasionada, entre otros.

5. CONCLUSIONES

- La presencia de especies patógenas para humanos de microsporidios, *Cyclospora* y *Cryptosporidium* en diferentes tipos de agua de la zona centro de España, indican su potencial de transmisión hídrica y señalan al agua como un factor de riesgo en la adquisición de estas parasitosis, considerándose un problema importante en salud pública.
- La diversidad de especies de microsporidios (*E. bieneusi*, *E. intestinalis*, *E. cuniculi* y *A. algerae*) y *Cryptosporidium* (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. muris*, *C. andersoni* y *C. ubiquitum*) encontrada en las muestras ambientales evaluadas, sugiere que tanto los humanos como los animales pueden actuar como una fuente de contaminación del agua en la zona centro de España.
- La identificación de especies patógenas de microsporidios en una variedad de hospedadores animales en España, sugiere un papel importante de los mismos en la transmisión de esta parasitosis, al actuar como fuentes potenciales de infección para el hombre y como agentes contaminantes de muestras ambientales.
- La descripción de los primeros casos de microsporidiosis intestinal por *E. bieneusi* en pacientes trasplantados en España, confirma que la diarrea ocasionada por estos parásitos no es exclusiva de los pacientes VIH (+) / sida, y que las personas sometidas a un tratamiento inmunosupresor constituyen un grupo de riesgo para la adquisición de dicha parasitosis.
- La variabilidad genotípica identificada en diferentes cepas de *E. intestinalis* y la aplicación de los nuevos marcadores moleculares establecidos en este trabajo, se constituyen en herramientas útiles para la clasificación y comparación de aislados de este microsporidio, así como también para la comprensión de aspectos biológicos, epidemiológicos y clínicos de esta infección.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abrahamsen, M. S., Templeton, T. J., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Zhu, G., Lancto, C. A., Deng, M., Liu, C., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G. A., Xu, P., Bankier, A. T., Dear, P. H., Konfortov, B. A., Spriggs, H. F., Iyer, L., Anantharaman, V., Aravind, L. y Kapur, V.** Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*. 2004; 304 (5669): 441-445.
- Abreu-Acosta, N., Lorenzo-Morales, J., Leal-Guio, Y., Coronado-Alvarez, N., Foronda, P., Alcoba-Florez, J., Izquierdo, F., Batista-Diaz, N., Del Aguila, C. y Valladares, B.** *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) in clinical samples from immunocompetent individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005; 99 (11): 848-855.
- Abubakar, I., Aliyu, S. H., Arumugam, C., Usman, N. K. y Hunter, P. R.** Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised individuals: systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol*. 2007; 63 (4): 387-393.
- Adam, R. D., Ortega, Y. R., Gilman, R. H. y Sterling, C. R.** Intervening transcribed spacer region 1 variability in *Cyclospora cayetanensis*. *J Clin Microbiol*. 2000; 38 (6): 2339-2343.
- Adl, S. M., Simpson, A. G., Lane, C. E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. y Spiegel, F. W.** The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*. 2012; 59 (5): 429-493.
- Akiyoshi, D. E., Morrison, H. G., Lei, S., Feng, X., Zhang, Q., Corradi, N., Mayanja, H., Tumwine, J. K., Keeling, P. J., Weiss, L. M. y Tzipori, S.** Genomic survey of the non-cultivable opportunistic human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi*. *PLoS Pathog*. 2009; 5 (1): e1000261.
- Alagappan, A., Bergquist, P. L. y Ferrari, B. C.** Development of a two-color fluorescence in situ hybridization technique for species-level identification of human-infectious *Cryptosporidium* spp. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75 (18): 5996-5998.
- Alagappan, A., Tujula, N. A., Power, M., Ferguson, C. M., Bergquist, P. L. y Ferrari, B. C.** Development of fluorescent in situ hybridization for *Cryptosporidium* detection reveals zoonotic and anthroponotic transmission of sporadic cryptosporidiosis in Sydney. *J Microbiol Methods*. 2008; 75 (3): 535-539.
- Almeida, A., Moreira, M. J., Soares, S., de Lurdes Delgado, M., Figueiredo, J., Magalhaes, E. S., Castro, A., Viana Da Costa, A. y Correia da Costa, J. M.** Biological and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* isolates from five hydrographical basins in northern Portugal. *Korean J Parasitol*. 2010; 48 (2): 105-111.
- Almeida, A., Moreira, M. J., Soares, S., Delgado Mde, L., Figueiredo, J., Silva, E., Castro, A. y Cosa, J. M.** Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in drinking water samples in the north of Portugal. *Korean J Parasitol*. 2010; 48 (1): 43-48.

- Alonso, J. L., Amoros, I. y Canigral, I.** Development and evaluation of a real-time PCR assay for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage samples. Appl Microbiol Biotechnol. 2011; 89 (4): 1203-1211.
- Alves, M., Ribeiro, A. M., Neto, C., Ferreira, E., Benoliel, M. J., Antunes, F. y Matos, O.** Distribution of *Cryptosporidium* species and subtypes in water samples in Portugal: a preliminary study. J Eukaryot Microbiol. 2006; 53 Suppl 1: S24-25.
- Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A. A., Matos, O. y Antunes, F.** Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. J Clin Microbiol. 2003; 41 (6): 2744-2747.
- Anane, S. y Attouchi, H.** Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. Gastroenterol Clin Biol. 2010; 34 (8-9): 450-464.
- Anderson, V. R. y Curran, M. P.** Nitazoxanide: a review of its use in the treatment of gastrointestinal infections. Drugs. 2007; 67 (13): 1947-1967.
- Andreu-Ballester, J. C., Garcia-Ballesteros, C., Amigo, V., Ballester, F., Gil-Borras, R., Catalan-Serra, I., Magnet, A., Fenoy, S., del Aguila, C., Ferrando-Marco, J. y Cuellar, C.** Microsporidia and its relation to Crohn's disease. A retrospective study. PLoS One. 2013; 8 (4): e62107.
- Artieda, J., Basterrechea, M., Arriola, L., Yagüe, M., Albisua, E., Arostegui, N., Astigarraga, U., Botello, R. y Manterola, J.** Outbreak of cryptosporidiosis in a child day-care centre in Gipuzkoa, Spain, October to December 2011. Euro Surveill. 2012; 17 (5): pii=20070.
- Asakura, T., Nakamura, S., Ohta, M., Une, Y. y Furuya, K.** Genetically unique microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* strain type III isolated from squirrel monkeys. Parasitol Int. 2006; 55 (2): 159-162.
- Avery, S. W. y Undeen, A. H.** The isolation of microsporidia and other pathogens from concentrated ditch water. J Am Mosq Control Assoc. 1987; 3 (1): 54-58.
- Bacchi, C. J., Weiss, L. M., Lane, S., Frydman, B., Valasinas, A., Reddy, V., Sun, J. S., Marton, L. J., Khan, I. A., Moretto, M., Yarlett, N. y Wittner, M.** Novel synthetic polyamines are effective in the treatment of experimental microsporidiosis, an opportunistic AIDS-associated infection. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46 (1): 55-61.
- Bakheit, M. A., Torra, D., Palomino, L. A., Thekisoe, O. M., Mbatia, P. A., Ongerth, J. y Karanis, P.** Sensitive and specific detection of *Cryptosporidium* species in PCR-negative samples by loop-mediated isothermal DNA amplification and confirmation of generated LAMP products by sequencing. Vet Parasitol. 2008; 158 (1-2): 11-22.
- Baldursson, S. y Karanis, P.** Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. Water Res. 2011; 45 (20): 6603-6614.
- Bankier, A. T., Spriggs, H. F., Fartmann, B., Konfortov, B. A., Madera, M., Vogel, C., Teichmann, S. A., Ivens, A. y Dear, P. H.** Integrated mapping, chromosomal sequencing and sequence analysis of *Cryptosporidium parvum*. Genome Res. 2003; 13 (8): 1787-1799.
- Bart, A., Wentink-Bonnema, E. M., Heddema, E. R., Buijs, J. y van Gool, T.** Frequent occurrence of human-associated microsporidia in fecal droppings of urban

pigeons in amsterdam, the Netherlands. Appl Environ Microbiol. 2008; 74 (22): 7056-7058.

Barta, J. R. y Thompson, R. C. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. Trends Parasitol. 2006; 22 (10): 463-468.

Bern, C., Hernandez, B., Lopez, M. B., Arrowood, M. J., de Mejia, M. A., de Merida, A. M., Hightower, A. W., Venczel, L., Herwaldt, B. L. y Klein, R. E. Epidemiologic studies of *Cyclospora cayetanensis* in Guatemala. Emerg Infect Dis. 1999; 5 (6): 766-774.

Bern, C., Kawai, V., Vargas, D., Rabke-Verani, J., Williamson, J., Chavez-Valdez, R., Xiao, L., Sulaiman, I., Vivar, A., Ticona, E., Navincopa, M., Cama, V., Moura, H., Secor, W. E., Visvesvara, G. y Gilman, R. H. The epidemiology of intestinal microsporidiosis in patients with HIV/AIDS in Lima, Peru. J Infect Dis. 2005; 191 (10): 1658-1664.

Bern, C., Ortega, Y., Checkley, W., Roberts, J. M., Lescano, A. G., Cabrera, L., Verastegui, M., Black, R. E., Sterling, C. y Gilman, R. H. Epidemiologic differences between cyclosporiasis and cryptosporidiosis in Peruvian children. Emerg Infect Dis. 2002; 8 (6): 581-585.

Betancourt, W. Q. y Rose, J. B. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. Vet Parasitol. 2004; 126 (1-2): 219-234.

Bicart-See, A., Massip, P., Linas, M. D. y Datry, A. Successful treatment with nitazoxanide of *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in a patient with AIDS. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44 (1): 167-168.

Bigliardi, E. y Sacchi, L. Cell biology and invasion of the microsporidia. Microbes Infect. 2001; 3 (5): 373-379.

Bodley-Tickell, A. T., Kitchen, S. E. y Sturdee, A. P. Occurrence of *Cryptosporidium* in agricultural surface waters during an annual farming cycle in lowland UK. Water Res. 2002; 36 (7): 1880-1886.

Bornay-Llinares, F. J., da Silva, A. J., Moura, H., Schwartz, D. A., Visvesvara, G. S., Pieniazek, N. J., Cruz-Lopez, A., Hernandez-Jauregui, P., Guerrero, J. y Enriquez, F. J. Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. J Infect Dis. 1998; 178 (3): 820-826.

Bornay-Llinares, F. J., Roig-Rico, P., Da Silva, A., Figueras, M. J., Moura, H. y Mayol, M. J. Microsporidiosis intestinal. Diagnóstico retrospectivo mediante métodos de microscopia y PCR usando primers diseñados a partir de la secuencia que codifica al rRNA de *Enterocytozoon bieneusi*. VII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Torremolinos. 1996.

Botero, J. H., Montoya, M. N., Vanegas, A. L., Diaz, A., Navarro-i-Martinez, L., Bornay, F. J., Izquierdo, F., del Aguila, C. y Agudelo Sdel, P. [Frequency of intestinal microsporidian infections in HIV-positive patients, as diagnosis by quick hot Gram chromotrope staining and PCR]. Biomedica. 2004; 24 (4): 375-384.

Botes, M., de Kwaadsteniet, M. y Cloete, T. E. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. Anal Bioanal Chem. 2013; 405 (1): 91-108.

- Brandonisio, O., Maggi, P., Panaro, M. A., Lisi, S., Andriola, A., Acquafredda, A. y Angarano, G.** Intestinal protozoa in HIV-infected patients in Apulia, South Italy. *Epidemiol Infect.* 1999; 123 (3): 457-462.
- Brasil, P., de Lima, D. B., de Paiva, D. D., Lobo, M. S., Sodre, F. C., da Silva, S. P., Verissimo-Villela, E., da Silva, E. J., Peralta, J. M., Morgado, M. y Moura, H.** Emerging and opportunistic intestinal parasites in HIV-infected patients with chronic diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. *J Eukaryot Microbiol.* 1999; 46 (5): 40S-41S.
- Brasil, P., de Paiva, D. D., de Lima, D. B., da Silva, E. J., Peralta, J. M., da Silva, A. J., Sodre, F. C., Villela, E. V. y Moura, H.** A 3-year follow-up of a Brazilian AIDS patient with protracted diarrhea caused by *Enterocytozoon bieneusi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1998; 40 (4): 215-218.
- Breitenmoser, A. C., Mathis, A., Burgi, E., Weber, R. y Deplazes, P.** High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans. *Parasitology.* 1999; 118 (Pt 5): 447-453.
- Breton, J., Bart-Delabesse, E., Biligui, S., Carbone, A., Seiller, X., Okome-Nkoumou, M., Nzamba, C., Kombila, M., Accoceberry, I. y Thellier, M.** New highly divergent rRNA sequence among biodiverse genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from humans in Gabon and Cameroon. *J Clin Microbiol.* 2007; 45 (8): 2580-2589.
- Caccio, S. M., Thompson, R. C., McLauchlin, J. y Smith, H. V.** Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 2005; 21 (9): 430-437.
- Cali, A., Kotler, D. P. y Orenstein, J. M.** *Septata intestinalis* N. G., N. Sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *J Eukaryot Microbiol.* 1993; 40 (1): 101-112.
- Calik, S., Karaman, U. y Colak, C.** Prevalence of microsporidium and other intestinal parasites in children from malatya, Turkey. *Indian J Microbiol.* 2011; 51 (3): 345-349.
- Cama, V. A., Ross, J. M., Crawford, S., Kawai, V., Chavez-Valdez, R., Vargas, D., Vivar, A., Ticona, E., Navincopa, M., Williamson, J., Ortega, Y., Gilman, R. H., Bern, C. y Xiao, L.** Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J Infect Dis.* 2007; 196 (5): 684-691.
- Candia, A., Lopez-Velez, R. y Perez-Elias, M. J.** *Enterocytozoon bieneusi* infection in an AIDS patient. *Res. and Rev. in. Parasitol.* 1994; 54: 269-271.
- Carey, C. M., Lee, H. y Trevors, J. T.** Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res.* 2004; 38 (4): 818-862.
- Carmena, D., Aguinagalde, X., Zigorraga, C., Fernandez-Crespo, J. C. y Ocio, J. A.** Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. *J Appl Microbiol.* 2007; 102 (3): 619-629.
- Carreno, R. A., Martin, D. S. y Barta, J. R.** *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol Res.* 1999; 85 (11): 899-904.
- Castro-Hermida, J. A., Garcia-Presedo, I., Almeida, A., Gonzalez-Warleta, M., Correia Da Costa, J. M. y Mezo, M.** Contribution of treated wastewater to the

- contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. Water Res. 2008; 42 (13): 3528-3538.
- Castro-Hermida, J. A., Garcia-Presedo, I., Almeida, A., Gonzalez-Warleta, M., Correia Da Costa, J. M. y Mezo, M.** Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water. Sci Total Environ. 2008; 405 (1-3): 45-53.
- Castro-Hermida, J. A., Garcia-Presedo, I., Almeida, A., Gonzalez-Warleta, M., Correia Da Costa, J. M. y Mezo, M.** *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain). Sci Total Environ. 2011; 409 (13): 2451-2459.
- Castro-Hermida, J. A., Garcia-Presedo, I., Almeida, A., Gonzalez-Warleta, M., Da Costa, J. M. y Mezo, M.** Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: a health risk for humans and animals. Water Res. 2009; 43 (17): 4133-4142.
- Castro-Hermida, J. A., Garcia-Presedo, I., Gonzalez-Warleta, M. y Mezo, M.** *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. Water Res. 2010; 44 (20): 5887-5896.
- Cegielski, J. P., Ortega, Y. R., McKee, S., Madden, J. F., Gaido, L., Schwartz, D. A., Manji, K., Jorgensen, A. F., Miller, S. E., Pulipaka, U. P., Msengi, A. E., Mwakyusa, D. H., Sterling, C. R. y Reller, L. B.** *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, and *Cyclospora* infections in pediatric and adult patients with diarrhea in Tanzania. Clin Infect Dis. 1999; 28 (2): 314-321.
- Cieloszyk, J., Goni, P., Garcia, A., Remacha, M. A., Sanchez, E. y Clavel, A.** Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012; 30 (9): 549-551.
- Clark, D. P.** New insights into human cryptosporidiosis. Clin Microbiol Rev. 1999; 12 (4): 554-563.
- Connor, B. A., Johnson, E. J. y Soave, R.** Reiter syndrome following protracted symptoms of *Cyclospora* infection. Emerg Infect Dis. 2001; 7 (3): 453-454.
- Cordon, G. P., Prados, A. H., Romero, D., Moreno, M. S., Pontes, A., Osuna, A. y Rosales, M. J.** Intestinal and haematic parasitism in the birds of the Almunecar (Granada, Spain) ornithological garden. Vet Parasitol. 2009; 165 (3-4): 361-366.
- Cornman, R. S., Chen, Y. P., Schatz, M. C., Street, C., Zhao, Y., Desany, B., Egholm, M., Hutchison, S., Pettis, J. S., Lipkin, W. I. y Evans, J. D.** Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. PLoS Pathog. 2009; 5 (6): e1000466.
- Corradi, N., Akiyoshi, D. E., Morrison, H. G., Feng, X., Weiss, L. M., Tzipori, S. y Keeling, P. J.** Patterns of genome evolution among the microsporidian parasites *Encephalitozoon cuniculi*, *Antonospora locustae* and *Enterocytozoon bieneusi*. PLoS One. 2007; 2 (12): e1277.
- Corradi, N., Haag, K. L., Pombert, J. F., Ebert, D. y Keeling, P. J.** Draft genome sequence of the Daphnia pathogen *Ooctosporea bayeri*: insights into the gene content of a large microsporidian genome and a model for host-parasite interactions. Genome Biol. 2009; 10 (10): R106.

- Corradi, N., Pombert, J. F., Farinelli, L., Didier, E. S. y Keeling, P. J.** The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nat Commun.* 2010; 1 (77): 1-7.
- Corradi, N. y Slamovits, C. H.** The intriguing nature of microsporidian genomes. *Brief Funct Genomics.* 2011; 10 (3): 115-124.
- Cotte, L., Rabodonirina, M., Chapuis, F., Bailly, F., Bissuel, F., Raynal, C., Gelas, P., Persat, F., Piens, M. A. y Trepo, C.** Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 1999; 180 (6): 2003-2008.
- Coupe, S., Delabre, K., Pouillot, R., Houdart, S., Santillana-Hayat, M. y Derouin, F.** Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienewsi* in surface water, including recreational areas: a one-year prospective study. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006; 47 (3): 351-359.
- Cox, J. C., Hamilton, R. C., Pye, D. y Edmonds, J. W.** The infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* in vivo and in vitro. *Z Parasitenkd.* 1986; 72 (1): 65-72.
- Coyle, C. M., Wittner, M., Kotler, D. P., Noyer, C., Orenstein, J. M., Tanowitz, H. B. y Weiss, L. M.** Prevalence of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienewsi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* among patients with AIDS-related diarrhea: determination by polymerase chain reaction to the microsporidian small-subunit rRNA gene. *Clin Infect Dis.* 1996; 23 (5): 1002-1006.
- Chacin-Bonilla, L.** Epidemiology of *Cyclospora cayentanensis*: A review focusing in endemic areas. *Acta Trop.* 2010; 115 (3): 181-193.
- Chalmers, R. M.** Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. *Ann Ist Super Sanita.* 2012; 48 (4): 429-446.
- Chalmers, R. M. y Katzer, F.** Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol.* 2013; 29 (5): 237-251.
- Chalmers, R. M., Smith, R., Elwin, K., Clifton-Hadley, F. A. y Giles, M.** Epidemiology of anthroponotic and zoonotic human cryptosporidiosis in England and Wales, 2004-2006. *Epidemiol Infect.* 2011; 139 (5): 700-712.
- Chen, X. M., Keithly, J. S., Paya, C. V. y LaRusso, N. F.** Cryptosporidiosis. *N Engl J Med.* 2002; 346 (22): 1723-1731.
- Cheng, H. W., Lucy, F. E., Graczyk, T. K., Broaders, M. A. y Mastitsky, S. E.** Municipal wastewater treatment plants as removal systems and environmental sources of human-virulent microsporidian spores. *Parasitol Res.* 2011; 109 (3): 595-603.
- Cheng, H. W., Lucy, F. E., Graczyk, T. K., Broaders, M. A., Tamang, L. y Connolly, M.** Fate of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts and *Giardia duodenalis* cysts during secondary wastewater treatments. *Parasitol Res.* 2009; 105 (3): 689-696.
- Chokephaibulkit, K., Wanachiwanawin, D., Tosasuk, K., Pavitpok, J., Vanprapar, N. y Chearskul, S.** Intestinal parasitic infections among human immunodeficiency virus-infected and -uninfected children hospitalized with diarrhea in Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2001; 32 (4): 770-775.
- Choudhary, M. M., Metcalfe, M. G., Arrambide, K., Bern, C., Visvesvara, G. S., Pieniazek, N. J., Bandea, R. D., Deleon-Carnes, M., Adem, P., Choudhary, M.**

- M., Zaki, S. R. y Saeed, M. U. *Tubulinosema* sp. microsporidian myositis in immunosuppressed patient. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17 (9): 1727-1730.
- Chu, D. M., Sherchand, J. B., Cross, J. H. y Orlandi, P. A. Detection of *Cyclospora cayetanensis* in animal fecal isolates from Nepal using an FTA filter-base polymerase chain reaction method. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 71 (4): 373-379.
- Dado, D., Izquierdo, F., Vera, O., Montoya, A., Mateo, M., Fenoy, S., Galvan, A. L., Garcia, S., Garcia, A., Aranguez, E., Lopez, L., del Aguila, C. y Miro, G. Detection of zoonotic intestinal parasites in public parks of Spain. Potential epidemiological role of microsporidia. *Zoonoses Public Health*. 2012; 59 (1): 23-28.
- Dascomb, K., Frazer, T., Clark, R. A., Kissinger, P. y Didier, E. Microsporidiosis and HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000; 24 (3): 290-292.
- Decraene, V., Lebbad, M., Botero-Kleiven, S., Gustavsson, A. M. y Lofdahl, M. First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. *Epidemiol Infect*. 2012; 140 (3): 519-527.
- del Aguila, C., Croppo, G. P., Moura, H., Da Silva, A. J., Leitch, G. J., Moss, D. M., Wallace, S., Slemenda, S. B., Pieniazek, N. J. y Visvesvara, G. S. Ultrastructure, immunofluorescence, western blot, and PCR analysis of eight isolates of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* established in culture from sputum and urine samples and duodenal aspirates of five patients with AIDS. *J Clin Microbiol*. 1998; 36 (5): 1201-1208.
- del Aguila, C. y Izquierdo, F. Advanced Research Workshop 'Emergent Pathogens in the 21st Century: First United Workshop on Microsporidia from Invertebrate and Vertebrate Hosts. Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic. 2004.
- del Aguila, C., Izquierdo, F., Navajas, R., Pieniazek, N. J., Miro, G., Alonso, A. I., Da Silva, A. J. y Fenoy, S. *Enterocytozoon bieneusi* in animals: rabbits and dogs as new hosts. *J Eukaryot Microbiol*. 1999; 46 (5): 8S-9S.
- del Aguila, C., Lopez-Velez, R., Fenoy, S., Turrientes, C., Cobo, J., Navajas, R., Visvesvara, G. S., Croppo, G. P., Da Silva, A. J. y Pieniazek, N. J. Identification of *Enterocytozoon bieneusi* spores in respiratory samples from an AIDS patient with a 2-year history of intestinal microsporidiosis. *J Clin Microbiol*. 1997; 35 (7): 1862-1866.
- del Aguila, C., Moura, H., Fenoy, S., Navajas, R., Lopez-Velez, R., Li, L., Xiao, L., Leitch, G. J., da Silva, A., Pieniazek, N. J., Lal, A. A. y Visvesvara, G. S. In vitro culture, ultrastructure, antigenic, and molecular characterization of *Encephalitozoon cuniculi* isolated from urine and sputum samples from a Spanish patient with AIDS. *J Clin Microbiol*. 2001; 39 (3): 1105-1108.
- del Aguila, C., Navajas, R., Gurbindo, D., Ramos, J. T., Mellado, M. J., Fenoy, S., Munoz Fernandez, M. A., Subirats, M., Ruiz, J. y Pieniazek, N. J. Microsporidiosis in HIV-positive children in Madrid (Spain). *J Eukaryot Microbiol*. 1997; 44 (6): 84S-85S.
- del Aguila, C., Rueda, C., De la Camara, C. y Fenoy, S. Seroprevalence of anti-*Encephalitozoon* antibodies in Spanish immunocompetent subjects. *J Eukaryot Microbiol*. 2001; Suppl: 75S-78S.

- del Aguila, C., Rueda, C., Haro, M., Scaglia, M., Gatti, S., Bornay-Llinares, F. J., Fenoy, S. y Henriques-Gil, N.** Genetic and immunologic characterization of seven *Encephalitozoon hellem* human strains. *J Eukaryot Microbiol.* 2001; Suppl: 66S-68S.
- del Aguila, C., Soriano, V., Navajas, R., Subirats, M., Fenoy, S., Valencia, E., Baquero, M. y Pieniazek, N. J.** Identificación específica de microsporidiosis intestinales en pacientes HIV-positivos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1997; 15 (9): 456-461.
- Delbac, F. y Polonais, V.** The microsporidian polar tube and its role in invasion. *Molecular mechanisms of parasite invasion.* 2008. J. Robin Harris. New York. Springer. 17. p 208-220.
- Dengjel, B., Zahler, M., Hermanns, W., Heinritzi, K., Spillmann, T., Thomschke, A., Loscher, T., Gothe, R. y Rinder, H.** Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. *J Clin Microbiol.* 2001; 39 (12): 4495-4499.
- Desportes-Livage, I., Doumbo, O., Pichard, E., Hilmarisdottir, I., Traore, H. A., Maiga, II, el Fakhry, Y. y Dolo, A.** Microsporidiosis in HIV-seronegative patients in Mali. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998; 92 (4): 423-424.
- Desportes, I., Le Charpentier, Y., Galian, A., Bernard, F., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Ravisse, P. y Modigliani, R.** Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J Protozool.* 1985; 32 (2): 250-254.
- Di Giovanni, G. D. y LeChevallier, M. W.** Quantitative-PCR assessment of *Cryptosporidium parvum* cell culture infection. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71 (3): 1495-1500.
- Dia, N., Lavie, L., Metenier, G., Toguebaye, B. S., Vivares, C. P. y Cornillot, E.** InterB multigenic family, a gene repertoire associated with subterminal chromosome regions of *Encephalitozoon cuniculi* and conserved in several human-infecting microsporidian species. *Curr Genet.* 2007; 51 (3): 171-186.
- Diaz, P., Quilez, J., Chalmers, R. M., Panadero, R., Lopez, C., Sanchez-Acedo, C., Morrondo, P. y Diez-Banos, P.** Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). *Parasitology.* 2010; 137 (8): 1187-1193.
- Didier, E. S.** Microsporidiosis. *Clin Infect Dis.* 1998; 27 (1): 1-7; quiz 8.
- Didier, E. S.** Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop.* 2005; 94 (1): 61-76.
- Didier, E. S., Didier, P. J., Snowden, K. F. y Shadduck, J. A.** Microsporidiosis in mammals. *Microbes Infect.* 2000; 2 (6): 709-720.
- Didier, E. S., Maddry, J. A., Kwong, C. D., Green, L. C., Snowden, K. F. y Shadduck, J. A.** Screening of compounds for antimicrosporidial activity in vitro. *Folia Parasitol (Praha).* 1998; 45 (2): 129-139.
- Didier, E. S., Rogers, L. B., Orenstein, J. M., Baker, M. D., Vossbrinck, C. R., Van Gool, T., Hartskeerl, R., Soave, R. y Beaudet, L. M.** Characterization of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. *J Eukaryot Microbiol.* 1996; 43 (1): 34-43.

- Didier, E. S., Stovall, M. E., Green, L. C., Brindley, P. J., Sestak, K. y Didier, P. J.** Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol.* 2004; 126 (1-2): 145-166.
- Didier, E. S., Vossbrinck, C. R., Baker, M. D., Rogers, L. B., Bertucci, D. C. y Shadduck, J. A.** Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology.* 1995; 111 (Pt 4): 411-421.
- Didier, E. S. y Weiss, L. M.** Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis.* 2006; 19 (5): 485-492.
- Didier, E. S. y Weiss, L. M.** Overview of microsporidia and microsporidiosis. *Protistology.* 2008; 5 (4): 243-255.
- Didier, E. S. y Weiss, L. M.** Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2011; 24 (5): 490-495.
- Didier, P. J., Didier, E. S., Orenstein, J. M. y Shadduck, J. A.** Fine structure of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, in culture. *J Protozool.* 1991; 38 (5): 502-507.
- Didier, P. J., Phillips, J. N., Kuebler, D. J., Nasr, M., Brindley, P. J., Stovall, M. E., Bowers, L. C. y Didier, E. S.** Antimicrosporidial activities of fumagillin, TNP-470, ovalicin, and ovalicin derivatives in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50 (6): 2146-2155.
- Dillingham, R. A., Lima, A. A. y Guerrant, R. L.** Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes Infect.* 2002; 4 (10): 1059-1066.
- Doller, P. C., Dietrich, K., Filipp, N., Brockmann, S., Dreweck, C., Vonthein, R., Wagner-Wiening, C. y Wiedenmann, A.** Cyclosporiasis outbreak in Germany associated with the consumption of salad. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8 (9): 992-994.
- Douttree, J. C., Maerz, A. L., Ryan, N. J., Baird, R. W., Wright, E., Crowe, S. M. y Marshall, J. A.** In vitro growth of the microsporidian *Septata intestinalis* from an AIDS patient with disseminated illness. *J Clin Microbiol.* 1995; 33 (2): 463-470.
- Dowd, S. E., Gerba, C. P. y Pepper, I. L.** Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64 (9): 3332-3335.
- Dowd, S. E., John, D., Eliopolus, J., Gerba, C. P., Naranjo, J., Klein, R., Lopez, B., de Mejia, M., Mendoza, C. E. y Pepper, I. L.** Confirmed detection of *Cyclospora cayetanensis*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* in water used for drinking. *J Water Health.* 2003; 1 (3): 117-123.
- DWI.** Drinking Water Inspectorate for England and Wales. The water supply (water quality) regulations. <http://dwi.defra.gov.uk/>. 2000.
- Eberhard, M. L., da Silva, A. J., Lilley, B. G. y Pieniazek, N. J.** Morphologic and molecular characterization of new *Cyclospora* species from Ethiopian monkeys: *C. cercopithecii* sp.n., *C. colobi* sp.n., and *C. papionis* sp.n. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5 (5): 651-658.
- el-Karamany, E. M., Zaher, T. I. y el-Bahnasawy, M. M.** Role of water in the transmission of cyclosporiasis in Sharkia Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol.* 2005; 35 (3): 953-962.

- Elshazly, A. M., Elsheikha, H. M., Soltan, D. M., Mohammad, K. A. y Morsy, T. A.** Protozoal pollution of surface water sources in Dakahlia Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol.* 2007; 37 (1): 51-64.
- Elwin, K., Hadfield, S. J., Robinson, G., Crouch, N. D. y Chalmers, R. M.** *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007-2011. *Int J Parasitol.* 2012; 42 (7): 675-682.
- Enriquez, F. J., Taren, D., Cruz-Lopez, A., Muramoto, M., Palting, J. D. y Cruz, P.** Prevalence of intestinal encephalitozoonosis in Mexico. *Clin Infect Dis.* 1998; 26 (5): 1227-1229.
- EPA.** Environmental Protection Agency U.S. CCL 2 List and Regulatory Determinations. <http://www.epa.gov/safewater/ccl/ccl2.html>. 2005.
- EPA.** Environmental Protection Agency U.S. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. <http://www.epa.gov/microbes/1623de05.pdf>. 2005.
- EPA.** Environmental Protection Agency U.S. Contaminant Candidate List 3 (CCL 3). <http://www.epa.gov/safewater/ccl/ccl3.html>. 2009.
- EPA.** Environmental Protection Agency U.S. Drinking Water Contaminants. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm#List>. 2009.
- Fayer, R.** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol.* 2004; 126 (1-2): 37-56.
- Fayer, R.** *Cryptosporidium* And Cryptosporidiosis. 2008. Florida. IWA publishing. Taylor & Francis Group. 580 p.
- Fayer, R.** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol.* 2010; 124 (1): 90-97.
- Fayer, R. y Santin, M.** *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet Parasitol.* 2009; 164 (2-4): 192-200.
- Fayer, R., Santin, M. y Macarisin, D.** *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet Parasitol.* 2010; 172 (1-2): 23-32.
- Fayer, R., Santin, M. y Trout, J. M.** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet Parasitol.* 2008; 156 (3-4): 191-198.
- Fedorko, D. P., Nelson, N. A., Didier, E. S., Bertucci, D., Delgado, R. M. y Hruszkewycz, A. M.** Speciation of human microsporidia by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65 (4): 397-401.
- Feng, Y., Li, N., Dearen, T., Lobo, M. L., Matos, O., Cama, V. y Xiao, L.** Development of a multilocus sequence typing tool for high-resolution genotyping of *Enterocytozoon bieneusi*. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77 (14): 4822-4828.
- Feng, Y., Li, N., Duan, L. y Xiao, L.** *Cryptosporidium* genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: evidence for possible unique *Cryptosporidium hominis* transmission. *J Clin Microbiol.* 2009; 47 (1): 153-157.
- Feng, Y., Zhao, X., Chen, J., Jin, W., Zhou, X., Li, N., Wang, L. y Xiao, L.** Occurrence, source, and human infection potential of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in source and tap water in shanghai, china. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77 (11): 3609-3616.

- Flores, J., Belleber, J., Terradez, J. y Monzo, E.** Lesiones agudas de la mucosa gástrica como forma de presentación de infección intestinal por *Microsporidium* en un paciente con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Med. Clin (Barc)*. 1993; 101: 719.
- Foucault, C. y Drancourt, M.** Actin mediates *Encephalitozoon intestinalis* entry into the human enterocyte-like cell line, Caco-2. *Microb Pathog*. 2000; 28 (2): 51-58.
- Fournier, S., Dubrou, S., Liguory, O., Gaussin, F., Santillana-Hayat, M., Sarfati, C., Molina, J. M. y Derouin, F.** Detection of Microsporidia, cryptosporidia and *Giardia* in swimming pools: a one-year prospective study. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002; 33 (3): 209-213.
- Fournier, S., Liguory, O., Santillana-Hayat, M., Guillot, E., Sarfati, C., Dumoutier, N., Molina, J. y Derouin, F.** Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000; 29 (2): 95-100.
- Franzen, C.** Microsporidia: how can they invade other cells? *Trends Parasitol*. 2004; 20 (6): 275-279.
- Franzen, C.** Microsporidia: A Review of 150 Years of Research. *The Open Parasitology Journal*. 2008; 2: 1-34.
- Franzen, C. y Muller, A.** Cryptosporidia and microsporidia--waterborne diseases in the immunocompromised host. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999; 34 (3): 245-262.
- Franzen, C. y Muller, A.** Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12 (2): 243-285.
- Franzen, C. y Muller, A.** Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect*. 2001; 3 (5): 389-400.
- Fryauff, D. J., Krippner, R., Prodjodipuro, P., Ewald, C., Kawengian, S., Pegelow, K., Yun, T., von Heydowloff-Wehnert, C., Oyofu, B. y Gross, R.** *Cyclospora cayentanensis* among expatriate and indigenous populations of West Java, Indonesia. *Emerg Infect Dis*. 1999; 5 (4): 585-588.
- Fuentealba, I. C., Mahoney, N. T., Shadduck, J. A., Harvill, J., Wicher, V. y Wicher, K.** Hepatic lesions in rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi* administered per rectum. *Vet Pathol*. 1992; 29 (6): 536-540.
- Furuya, K.** Genotyping of *Encephalitozoon cuniculi* isolates found in Hokkaido. *Jpn J Infect Dis*. 2002; 55 (4): 128-130.
- Gainzarain, J. C., Canut, A., Lozano, M., Labora, A., Carreras, F., Fenoy, S., Navajas, R., Pieniazek, N. J., da Silva, A. J. y del Aguila, C.** Detection of *Enterocytozoon bieneusi* in two human immunodeficiency virus-negative patients with chronic diarrhea by polymerase chain reaction in duodenal biopsy specimens and review. *Clin Infect Dis*. 1998; 27 (2): 394-398.
- Gajadhar, A. A. y Allen, J. R.** Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites. *Vet Parasitol*. 2004; 126 (1-2): 3-14.
- Galmes, A., Nicolau, A., Arbona, G., Smith-Palmer, A., Hernandez Pezzi, G. y Soler, P.** Cryptosporidiosis outbreak in British tourist who stayed at a hotel in Majorca, Spain. *Eurosurveillance*. 2003; 7 (33): pii 2275.

- Galvan-Diaz, A. L., Herrera-Jaramillo, V., Santos-Rodriguez, Z. M. y Delgado-Naranjo, M.** [Modified Ziehl-Neelsen and modified Safranin staining for diagnosing *Cyclospora cayetanensis*]. Rev Salud Publica (Bogota). 2008; 10 (3): 488-493.
- Galvan, A. L., Sanchez, A. M., Valentin, M. A., Henriques-Gil, N., Izquierdo, F., Fenoy, S. y del Aguila, C.** First cases of microsporidiosis in transplant recipients in Spain and review of the literature. J Clin Microbiol. 2011; 49 (4): 1301-1306.
- Gamboa Dominguez, A., Bencosme Vinas, C. y Kato Maeda, M.** [Microsporidiasis in AIDS patients with chronic diarrhea. Experiences at the National Institute of Nutrition "Salvador Zubirán"]. Rev Gastroenterol Mex. 1999; 64 (2): 70-74.
- Garcia-Lopez, H. L., Rodriguez-Tovar, L. E. y Medina-De la Garza, C. E.** Identification of *Cyclospora* in poultry. Emerg Infect Dis. 1996; 2 (4): 356-357.
- Garcia, L. S.** Laboratory identification of the microsporidia. J Clin Microbiol. 2002; 40 (6): 1892-1901.
- Gascon, J., Alvarez, M., Eugenia Valls, M., Maria Bordas, J., Teresa Jimenez De Anta, M. y Corachan, M.** [Cyclosporiasis: a clinical and epidemiological study in travellers with imported *Cyclospora cayetanensis* infection]. Med Clin (Barc). 2001; 116 (12): 461-464.
- Gennaccaro, A. L., McLaughlin, M. R., Quintero-Betancourt, W., Huffman, D. E. y Rose, J. B.** Infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in final reclaimed effluent. Appl Environ Microbiol. 2003; 69 (8): 4983-4984.
- Georges, E., Rabaud, C., Amiel, C., Kures, L., Guedenet, J. C., Allamagny, E., May, T. y Canton, P.** *Enterocytozoon bienersi* multiorgan microsporidiosis in a HIV-infected patient. J Infect. 1998; 36 (2): 223-225.
- Ghosh, K. y Weiss, L. M.** Molecular diagnostic tests for microsporidia. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009; 2009: 926521.
- Girones, R., Ferrus, M. A., Alonso, J. L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., Correa Ade, A., Hundesa, A., Carratala, A. y Bofill-Mas, S.** Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. Water Res. 2010; 44 (15): 4325-4339.
- Goetz, M., Eichenlaub, S., Pape, G. R. y Hoffmann, R. M.** Chronic diarrhea as a result of intestinal microsporidiosis in a liver transplant recipient. Transplantation. 2001; 71 (2): 334-337.
- Gomez-Couso, H., Mendez-Hermida, F., Castro-Hermida, J. A. y Ares-Mazas, E.** *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. J Food Prot. 2006; 69 (1): 185-190.
- Graczyk, T. K., Bosco-Nizeyi, J., da Silva, A. J., Moura, I. N., Pieniazek, N. J., Cranfield, M. R. y Lindquist, H. D.** A single genotype of *Encephalitozoon intestinalis* infects free-ranging gorillas and people sharing their habitats in Uganda. Parasitol Res. 2002; 88 (10): 926-931.
- Graczyk, T. K., Johansson, M. A., Tamang, L., Visvesvara, G. S., Moura, L. S., DaSilva, A. J., Girouard, A. S. y Matos, O.** Retrospective species identification of microsporidian spores in diarrheic fecal samples from human immunodeficiency virus/AIDS patients by multiplexed fluorescence in situ hybridization. J Clin Microbiol. 2007; 45 (4): 1255-1260.

- Graczyk, T. K., Kacprzak, M., Neczaj, E., Tamang, L., Graczyk, H., Lucy, F. E. y Girouard, A. S.** Human-virulent microsporidian spores in solid waste landfill leachate and sewage sludge, and effects of sanitization treatments on their inactivation. *Parasitol Res.* 2007; 101 (3): 569-575.
- Graczyk, T. K., Lucy, F. E., Mashinsky, Y., Andrew Thompson, R. C., Koru, O. y Dasilva, A. J.** Human zoonotic enteropathogens in a constructed free-surface flow wetland. *Parasitol Res.* 2009; 105 (2): 423-428.
- Graczyk, T. K., Lucy, F. E., Tamang, L., Mashinski, Y., Broaders, M. A., Connolly, M. y Cheng, H. W.** Propagation of human enteropathogens in constructed horizontal wetlands used for tertiary wastewater treatment. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75 (13): 4531-4538.
- Graczyk, T. K., Lucy, F. E., Tamang, L. y Mirafior, A.** Human enteropathogen load in activated sewage sludge and corresponding sewage sludge end products. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73 (6): 2013-2015.
- Graczyk, T. K., Sunderland, D., Awantang, G. N., Mashinski, Y., Lucy, F. E., Graczyk, Z., Chomicz, L. y Breysse, P. N.** Relationships among bather density, levels of human waterborne pathogens, and fecal coliform counts in marine recreational beach water. *Parasitol Res.* 2010; 106 (5): 1103-1108.
- Graczyk, T. K., Sunderland, D., Rule, A. M., da Silva, A. J., Moura, I. N., Tamang, L., Girouard, A. S., Schwab, K. J. y Breysse, P. N.** Urban feral pigeons (*Columba livia*) as a source for air- and waterborne contamination with *Enterocytozoon bieneusi* spores. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73 (13): 4357-4358.
- Graczyk, T. K., Sunderland, D., Tamang, L., Lucy, F. E. y Breysse, P. N.** Bather density and levels of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and pathogenic microsporidian spores in recreational bathing water. *Parasitol Res.* 2007; 101 (6): 1729-1731.
- Graczyk, T. K., Sunderland, D., Tamang, L., Shields, T. M., Lucy, F. E. y Breysse, P. N.** Quantitative evaluation of the impact of bather density on levels of human-virulent microsporidian spores in recreational water. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73 (13): 4095-4099.
- Gray, M. L., Puette, M. y Latimer, K. S.** Microsporidiosis in a young ostrich (*Struthio camelus*). *Avian Dis.* 1998; 42 (4): 832-836.
- Guy, R. A., Payment, P., Krull, U. J. y Horgen, P. A.** Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69 (9): 5178-5185.
- Guzman, C., Jofre, J., Montemayor, M. y Lucena, F.** Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *J Appl Microbiol.* 2007; 103 (6): 2420-2429.
- Hadfield, S. J., Robinson, G., Elwin, K. y Chalmers, R. M.** Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2011; 49 (3): 918-924.
- Haro, M., Del Aguila, C., Fenoy, S. y Henriques-Gil, N.** Intraspecies genotype variability of the microsporidian parasite *Encephalitozoon hellem*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (9): 4166-4171.

- Haro, M., Henriques-Gil, N., Fenoy, S., Izquierdo, F., Alonso, F. y Del Aguila, C.** Detection and genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in pigeons. J Eukaryot Microbiol. 2006; 53 Suppl 1: S58-60.
- Haro, M., Izquierdo, F., Henriques-Gil, N., Andres, I., Alonso, F., Fenoy, S. y del Aguila, C.** First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. Appl Environ Microbiol. 2005; 71 (6): 3153-3157.
- Harrington, G., Xagorarakis, I., Assavasilavasukul, P. y Standridge, J.** Effect of filtration conditions on removal of emerging waterborne pathogens. J AWWA. 2003; 95 (12): 95-104.
- Hashimoto, A., Hirata, T. y Kunikane, S.** Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in a conventional water purification plant. Water Sci Technol. 2001; 43 (12): 89-92.
- Hayman, J. R., Southern, T. R. y Nash, T. E.** Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells in vitro. Infect Immun. 2005; 73 (2): 841-848.
- Heiges, M., Wang, H., Robinson, E., Aurrecoechea, C., Gao, X., Kaluskar, N., Rhodes, P., Wang, S., He, C. Z., Su, Y., Miller, J., Kraemer, E. y Kissinger, J. C.** CryptoDB: a *Cryptosporidium* bioinformatics resource update. Nucleic Acids Res. 2006; 34 (Database issue): D419-422.
- Helmi, K., Skrabber, S., Burnet, J. B., Leblanc, L., Hoffmann, L. y Cauchie, H. M.** Two-year monitoring of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* occurrence in a recreational and drinking water reservoir using standard microscopic and molecular biology techniques. Environ Monit Assess. 2011; 179 (1-4): 163-175.
- Helmy, M. M.** *Cyclospora cayetanensis*: a review, focusing on some of the remaining questions about cyclosporiasis. Infect Disord Drug Targets. 2010; 10 (5): 368-375.
- Henriques-Gil, N., Haro, M., Izquierdo, F., Fenoy, S. y del Aguila, C.** Phylogenetic approach to the variability of the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* and its implications for inter- and intrahost transmission. Appl Environ Microbiol. 2010; 76 (10): 3333-3342.
- Herwaldt, B. L.** *Cyclospora cayetanensis*: a review, focusing on the outbreaks of cyclosporiasis in the 1990s. Clin Infect Dis. 2000; 31 (4): 1040-1057.
- Hester, J. D., Lindquist, H. D., Bobst, A. M. y Schaefer, F. W., 3rd.** Fluorescent in situ detection of *Encephalitozoon hellem* spores with a 6-carboxyfluorescein-labeled ribosomal RNA-targeted oligonucleotide probe. J Eukaryot Microbiol. 2000; 47 (3): 299-308.
- Hester, J. D., Varma, M., Bobst, A. M., Ware, M. W., Lindquist, H. D. y Schaefer, F. W., 3rd.** Species-specific detection of three human-pathogenic microsporidial species from the genus *Encephalitozoon* via fluorogenic 5' nuclease PCR assays. Mol Cell Probes. 2002; 16 (6): 435-444.
- Higgins, J. A., Fayer, R., Trout, J. M., Xiao, L., Lal, A. A., Kerby, S. y Jenkins, M. C.** Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. J Microbiol Methods. 2001; 47 (3): 323-337.
- Hijjawi, N. S., Meloni, B. P., Ryan, U. M., Olson, M. E. y Thompson, R. C.** Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence

- of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. Int J Parasitol. 2002; 32 (14): 1719-1726.
- Hoge, C. W., Shlim, D. R. y Echeverria, P.** Cyanobacterium-like cyclospora species. N Engl J Med. 1993; 329 (20): 1504-1505.
- Homem, C. G., Nakamura, A. A., Silva, D. C., Teixeira, W. F., Coelho, W. M. y Meireles, M. V.** Real-time PCR assay targeting the actin gene for the detection of *Cryptosporidium parvum* in calf fecal samples. Parasitol Res. 2012; 110 (5): 1741-1745.
- Hsu, B. M., Huang, C., Hsu, Y. F., Jiang, G. Y. y Hsu, C. L.** Evaluation of two concentration methods for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. Water Res. 2001; 35 (2): 419-424.
- Huang, P., Weber, J. T., Sosin, D. M., Griffin, P. M., Long, E. G., Murphy, J. J., Kocka, F., Peters, C. y Kallick, C.** The first reported outbreak of diarrheal illness associated with *Cyclospora* in the United States. Ann Intern Med. 1995; 123 (6): 409-414.
- Hutin, Y. J., Sombardier, M. N., Liguory, O., Sarfati, C., Derouin, F., Modai, J. y Molina, J. M.** Risk factors for intestinal microsporidiosis in patients with human immunodeficiency virus infection: a case-control study. J Infect Dis. 1998; 178 (3): 904-907.
- Ibáñez, R., Álvarez, D., Gonzalo, A., Sánchez-Zaballos, I. y Hernández, J. M.** Diarrea prolongada en adulto inmunocompetente. Enf Inf Microbiol Clin. 1999; 17: 529-530.
- Imre, K., Lobo, L. M., Matos, O., Popescu, C., Genchi, C. y Darabus, G.** Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in Romania: is there an actual risk of zoonotic infections? Vet Parasitol. 2011; 181 (2-4): 321-324.
- Insulander, M., Svenungsson, B., Lebbad, M., Karlsson, L. y de Jong, B.** A foodborne outbreak of *Cyclospora* infection in Stockholm, Sweden. Foodborne Pathog Dis. 2010; 7 (12): 1585-1587.
- Izquierdo, F.** Microsporidiosis: Estudio en hospedadores animales próximos al hombre. Desarrollo, producción y caracterización de anticuerpos monoclonales. Tesis de Doctorado. Universidad San Pablo CEU. Madrid. 2007. 361 p.
- Izquierdo, F., Castro Hermida, J. A., Fenoy, S., Mezo, M., Gonzalez-Warleta, M. y del Aguila, C.** Detection of microsporidia in drinking water, wastewater and recreational rivers. Water Res. 2011; 45 (16): 4837-4843.
- Jex, A. R. y Gasser, R. B.** Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of "next generation" technologies--research review. Biotechnol Adv. 2010; 28 (1): 17-26.
- Jiang, J., Alderisio, K. A., Singh, A. y Xiao, L.** Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. Appl Environ Microbiol. 2005; 71 (3): 1135-1141.
- Jiang, J., Alderisio, K. A. y Xiao, L.** Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. Appl Environ Microbiol. 2005; 71 (8): 4446-4454.

- Jirku, M., Valigurova, A., Koudela, B., Krizek, J., Modry, D. y Slapeta, J.** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol (Praha)*. 2008; 55 (2): 81-94.
- Karanis, P. y Aldeyarbi, H. M.** Evolution of *Cryptosporidium* in vitro culture. *Int J Parasitol*. 2011; 41 (12): 1231-1242.
- Karanis, P., Kourenti, C. y Smith, H.** Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health*. 2007; 5 (1): 1-38.
- Karanis, P., Thekisoe, O., Kiouptsi, K., Ongerth, J., Igarashi, I. y Inoue, N.** Development and preliminary evaluation of a loop-mediated isothermal amplification procedure for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal and water samples. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73 (17): 5660-5662.
- Kasickova, D., Sak, B., Kvac, M. y Ditrich, O.** Sources of potentially infectious human microsporidia: molecular characterisation of microsporidia isolates from exotic birds in the Czech Republic, prevalence study and importance of birds in epidemiology of the human microsporidial infections. *Vet Parasitol*. 2009; 165 (1-2): 125-130.
- Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Metenier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J. y Vivares, C. P.** Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*. 2001; 414 (6862): 450-453.
- Keeling, P.** Five questions about microsporidia. *PLoS Pathog*. 2009; 5 (9): e1000489.
- Keeling, P. J. y Corradi, N.** Shrink it or lose it: balancing loss of function with shrinking genomes in the microsporidia. *Virulence*. 2011; 2 (1): 67-70.
- Keeling, P. J., Corradi, N., Morrison, H. G., Haag, K. L., Ebert, D., Weiss, L. M., Akiyoshi, D. E. y Tzipori, S.** The reduced genome of the parasitic microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* lacks genes for core carbon metabolism. *Genome Biol Evol*. 2010; 2: 304-309.
- Keeling, P. J. y Fast, N. M.** MICROSPORIDIA: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annu Rev Microbiol*. 2002; 56: 93-116.
- Keeling, P. J., Fast, N. M., Law, J. S., Williams, B. A. y Slamovits, C. H.** Comparative genomics of microsporidia. *Folia Parasitol (Praha)*. 2005; 52 (1-2): 8-14.
- Keeling, P. J. y McFadden, G. I.** Origins of microsporidia. *Trends Microbiol*. 1998; 6 (1): 19-23.
- Keeling, P. J. y Slamovits, C. H.** Simplicity and complexity of microsporidian genomes. *Eukaryot Cell*. 2004; 3 (6): 1363-1369.
- Kothavade, R. J.** Potential molecular tools for assessing the public health risk associated with waterborne *Cryptosporidium* oocysts. *J Med Microbiol*. 2012; 61 (Pt 8): 1039-1051.
- Kotler, D. P. y Orenstein, J. M.** Prevalence of intestinal microsporidiosis in HIV-infected individuals referred for gastroenterological evaluation. *Am J Gastroenterol*. 1994; 89 (11): 1998-2002.

- Koudela, B., Vitovec, J., Kucerova, Z., Ditrich, O. y Travnicek, J.** The severe combined immunodeficient mouse as a model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. *Folia Parasitol (Praha)*. 1993; 40 (4): 279-286.
- Kvac, M., Kestranova, M., Pinkova, M., Kvetonova, D., Kalinova, J., Wagnerova, P., Kotkova, M., Vitovec, J., Ditrich, O., McEvoy, J., Stenger, B. y Sak, B.** *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet Parasitol*. 2013; 191 (3-4): 218-227.
- Kwakye-Nuako, G., Borketey, P., Mensah-Attipoe, I., Asmah, R. y Ayeh-Kumi, P.** Sachet drinking water in accra: the potential threats of transmission of enteric pathogenic protozoan organisms. *Ghana Med J*. 2007; 41 (2): 62-67.
- Lalonde, L. F. y Gajadhar, A. A.** Highly sensitive and specific PCR assay for reliable detection of *Cyclospora cayetanensis* oocysts. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74 (14): 4354-4358.
- Lalonde, L. F. y Gajadhar, A. A.** Detection and differentiation of coccidian oocysts by real-time PCR and melting curve analysis. *J Parasitol*. 2011; 97 (4): 725-730.
- Lanternier, F., Boutboul, D., Menotti, J., Chandesris, M. O., Sarfati, C., Mamzer Bruneel, M. F., Calmus, Y., Mechai, F., Viard, J. P., Lecuit, M., Bougnoux, M. E. y Lortholary, O.** Microsporidiosis in solid organ transplant recipients: two *Enterocytozoon bieneusi* cases and review. *Transpl Infect Dis*. 2009; 11 (1): 83-88.
- Latib, M. A., Pascoe, M. D., Duffield, M. S. y Kahn, D.** Microsporidiosis in the graft of a renal transplant recipient. *Transpl Int*. 2001; 14 (4): 274-277.
- Leav, B. A., Mackay, M. y Ward, H. D.** *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. *Clin Infect Dis*. 2003; 36 (7): 903-908.
- Leav, B. A., Mackay, M. R., Anyanwu, A., RM, O. C., Cevallos, A. M., Kindra, G., Rollins, N. C., Bennish, M. L., Nelson, R. G. y Ward, H. D.** Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. *Infect Immun*. 2002; 70 (7): 3881-3890.
- Lee, S. C., Corradi, N., Byrnes, E. J., 3rd, Torres-Martinez, S., Dietrich, F. S., Keeling, P. J. y Heitman, J.** Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Curr Biol*. 2008; 18 (21): 1675-1679.
- Lee, S. C., Corradi, N., Doan, S., Dietrich, F. S., Keeling, P. J. y Heitman, J.** Evolution of the sex-related locus and genomic features shared in microsporidia and fungi. *PLoS One*. 2010; 5 (5): e10539.
- Leelayoova, S., Subrungruang, I., Suputtamongkol, Y., Worapong, J., Petmitr, P. C. y Mungthin, M.** Identification of genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* from stool samples from human immunodeficiency virus-infected patients in Thailand. *J Clin Microbiol*. 2006; 44 (8): 3001-3004.
- Leitch, G. J. y He, Q.** Cryptosporidiosis-an overview. *J Biomed Res*. 2012; 25 (1): 1-16.
- Lemos, V., Graczyk, T. K., Alves, M., Lobo, M. L., Sousa, M. C., Antunes, F. y Matos, O.** Identification and determination of the viability of *Giardia lamblia* cysts and *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts in human fecal and

water supply samples by fluorescent in situ hybridization (FISH) and monoclonal antibodies. *Parasitol Res.* 2005; 98 (1): 48-53.

Levantesi, C., La Mantia, R., Masciopinto, C., Bockelmann, U., Ayuso-Gabella, M. N., Salgot, M., Tandoi, V., Van Houtte, E., Wintgens, T. y Grohmann, E. Quantification of pathogenic microorganisms and microbial indicators in three wastewater reclamation and managed aquifer recharge facilities in Europe. *Sci Total Environ.* 2010; 408 (21): 4923-4930.

Li, G., Xiao, S., Zhou, R., Li, W. y Wadeh, H. Molecular characterization of *Cyclospora*-like organism from dairy cattle. *Parasitol Res.* 2007; 100 (5): 955-961.

Li, W., Cama, V., Akinbo, F. O., Ganguly, S., Kiulia, N. M., Zhang, X. y Xiao, L. Multilocus sequence typing of *Enterocytozoon bieneusi*: Lack of geographic segregation and existence of genetically isolated sub-populations. *Infect Genet Evol.* 2012; 14C: 111-119.

Liguory, O., Fournier, S., Sarfati, C., Derouin, F. y Molina, J. M. Genetic homology among thirteen *Encephalitozoon intestinalis* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected patients with intestinal microsporidiosis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38 (6): 2389-2391.

Liguory, O., Sarfati, C., Derouin, F. y Molina, J. M. Evidence of different *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in patients with and without human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol.* 2001; 39 (7): 2672-2674.

Limor, J. R., Lal, A. A. y Xiao, L. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (7): 2335-2338.

Lipp, E. K., Farrah, S. A. y Rose, J. B. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Mar Pollut Bull.* 2001; 42 (4): 286-293.

Liu, A., Ji, H., Wang, E., Liu, J., Xiao, L., Shen, Y., Li, Y., Zhang, W. y Ling, H. Molecular identification and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia duodenalis* in raw urban wastewater in Harbin, China. *Parasitol Res.* 2011; 109 (3): 913-918.

Lobo, M. L., Xiao, L., Antunes, F. y Matos, O. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. *Lett Appl Microbiol.* 2009; 48 (6): 732-737.

Lobo, M. L., Xiao, L., Antunes, F. y Matos, O. Microsporidia as emerging pathogens and the implication for public health: a 10-year study on HIV-positive and -negative patients. *Int J Parasitol.* 2012; 42 (2): 197-205.

Lobo, M. L., Xiao, L., Cama, V., Magalhaes, N., Antunes, F. y Matos, O. Identification of potentially human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in various birds. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72 (11): 7380-7382.

Lobo, M. L., Xiao, L., Cama, V., Stevens, T., Antunes, F. y Matos, O. Genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in mammals in Portugal. *J Eukaryot Microbiol.* 2006; 53 Suppl 1: S61-64.

Lobo, M. S., Xiao, L., Antunes, F. y Matos, O. Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and microsporidia in water supplies in Portugal, abstr. PO54. 10th International Workshops on Opportunistic Protists. Boston. 2008.

- Loganthan, S., Yang, R., Bath, A., Gordon, C. y Ryan, U.** Prevalence of *Cryptosporidium* species in recreational versus non-recreational water sources. *Exp Parasitol.* 2012; 131 (4): 399-403.
- Lopez-Velez, R., Turrientes, M. C., Garron, C., Montilla, P., Navajas, R., Fenoy, S. y del Aguila, C.** Microsporidiosis in travelers with diarrhea from the tropics. *J Travel Med.* 1999; 6 (4): 223-227.
- Lopez, A. S., Bendik, J. M., Alliance, J. Y., Roberts, J. M., da Silva, A. J., Moura, I. N., Arrowood, M. J., Eberhard, M. L. y Herwaldt, B. L.** Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis* and other intestinal parasites in a community in Haiti. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (5): 2047-2054.
- Lores, B.** Aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico y la epidemiología de las infecciones por microsporidios (Phylum Microsporidia) en la provincia de Pontevedra (NO., España). Tesis de doctorado. Universidad de Vigo. Vigo. 1999. 175 p.
- Lores, B., Arias, C., Fenoy, S., Iglesias, I., Ocampo, A., Miralles, C., Garcia Estevez, J. M. y del Aguila, C.** *Enterocytozoon bienewi*: a common opportunistic parasite in lungs of HIV-positive patients? *J Eukaryot Microbiol.* 1999; 46 (5): 6S-7S.
- Lores, B., del Aguila, C. y Arias, C.** *Enterocytozoon bienewi* (microsporidia) in faecal samples from domestic animals from Galicia, Spain. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97 (7): 941-945.
- Lores, B., Lopez-Miragaya, I., Arias, C., Fenoy, S., Torres, J. y del Aguila, C.** Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienewi* in elderly human immunodeficiency virus--negative patients from Vigo, Spain. *Clin Infect Dis.* 2002; 34 (7): 918-921.
- Llorente, M. T., Clavel, A., Goni, M. P., Varea, M., Seral, C., Becerril, R., Suarez, L. y Gomez-Lus, R.** Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitol Int.* 2007; 56 (3): 201-205.
- Mac Kenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B. y et al.** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med.* 1994; 331 (3): 161-167.
- Madico, G., McDonald, J., Gilman, R. H., Cabrera, L. y Sterling, C. R.** Epidemiology and treatment of *Cyclospora cayetanensis* infection in Peruvian children. *Clin Infect Dis.* 1997; 24 (5): 977-981.
- Magnet, A., Galvan, A. L., Fenoy, S., Izquierdo, F., Rueda, C., Fernandez Vadillo, C., Perez-Irezabal, J., Bandyopadhyay, K., Visvesvara, G. S., da Silva, A. J. y Del Aguila, C.** Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitol Res.* 2012: 383-392.
- Malato, S., Fernández-Ibáñez, P., Maldonado, M. I., Blanco, J. y Gernjak, W.** Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today.* 2009; 147: 1-59.
- Mallon, M., MacLeod, A., Wastling, J., Smith, H., Reilly, B. y Tait, A.** Population structures and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. *J Mol Evol.* 2003; 56 (4): 407-417.

- Mansfield, L. S. y Gajadhar, A. A.** *Cyclospora cayetanensis*, a food- and waterborne coccidian parasite. *Vet Parasitol.* 2004; 126 (1-2): 73-90.
- Marshall, M. M., Naumovitz, D., Ortega, Y. y Sterling, C. R.** Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10 (1): 67-85.
- Martin-Ampudia, M., Mariscal, A., Lopez-Gigosos, R. M., Mora, L. y Fernandez-Crehuet, J.** Under-notification of cryptosporidiosis by routine clinical and laboratory practices among non-hospitalised children with acute diarrhoea in Southern Spain. *Infection.* 2012; 40 (2): 113-119.
- Mathis, A., Tanner, I., Weber, R. y Deplazes, P.** Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *Int J Parasitol.* 1999; 29 (5): 767-770.
- Mathis, A., Weber, R. y Deplazes, P.** Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18 (3): 423-445.
- Matos, O., Lobo, M. L. y Xiao, L.** Epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* Infection in Humans. *J Parasitol Res.* 2012; 2012: 981424.
- McCuin, R. M. y Clancy, J. L.** Modifications to United States Environmental Protection Agency methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69 (1): 267-274.
- McDougall, R. J., Tandy, M. W., Boreham, R. E., Stenzel, D. J. y O'Donoghue, P. J.** Incidental finding of a microsporidian parasite from an AIDS patient. *J Clin Microbiol.* 1993; 31 (2): 436-439.
- McInnes, E. F. y Stewart, C. G.** The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. *J S Afr Vet Assoc.* 1991; 62 (2): 51-54.
- Medema, G., Teunis, P., Blokker, M., Deere, D., Davison, A., Charles, P. y Loret, J.** WHO Guidelines for Drinking Water Quality. *Cryptosporidium*. http://www.who.int/water_sanitation_health/gdwqrevision/cryptodraft2.pdf. 2006.
- Menotti, J., Cassinat, B., Porcher, R., Sarfati, C., Derouin, F. y Molina, J. M.** Development of a real-time polymerase-chain-reaction assay for quantitative detection of *Enterocytozoon bieneusi* DNA in stool specimens from immunocompromised patients with intestinal microsporidiosis. *J Infect Dis.* 2003; 187 (9): 1469-1474.
- Menotti, J., Cassinat, B., Sarfati, C., Liguory, O., Derouin, F. y Molina, J. M.** Development of a real-time PCR assay for quantitative detection of *Encephalitozoon intestinalis* DNA. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (4): 1410-1413.
- Metenier, G. y Vivares, C. P.** Molecular characteristics and physiology of microsporidia. *Microbes Infect.* 2001; 3 (5): 407-415.
- Metge, S., Van Nhieu, J. T., Dahmane, D., Grimbert, P., Foulet, F., Sarfati, C. y Bretagne, S.** A case of *Enterocytozoon bieneusi* infection in an HIV-negative renal transplant recipient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000; 19 (3): 221-223.
- Miegeville, M., Koubi, V., Dan, L. C., Barbier, J. P. y Cam, P. D.** [*Cyclospora cayetanensis* presence in aquatic surroundings in Hanoi (Vietnam). Environmental study (well water, lakes and rivers)]. *Bull Soc Pathol Exot.* 2003; 96 (3): 149-152.

- Miro, O., Moreno, A., Valls, M. E., Miro, J. M., Pique, J. M., Bordas, J. M., Moreno-Martinez, A., Bombi, J. A. y Gatell, J. M.** Microsporidiosis intestinal en enfermos con sida: estudio de tres casos. *Medicina Clínica*. 1995; 104 (3): 96-99.
- Mogi, T. y Kita, K.** Diversity in mitochondrial metabolic pathways in parasitic protists *Plasmodium* and *Cryptosporidium*. *Parasitol Int*. 2010; 59 (3): 305-312.
- Molina, J. M., Goguel, J., Sarfati, C., Chastang, C., Desportes-Livage, I., Michiels, J. F., Maslo, C., Katlama, C., Cotte, L., Leport, C., Raffi, F., Derouin, F. y Modai, J.** Potential efficacy of fumagillin in intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with HIV infection: results of a drug screening study. The French Microsporidiosis Study Group. *AIDS*. 1997; 11 (13): 1603-1610.
- Molina, J. M., Tourneur, M., Sarfati, C., Chevret, S., de Gouvello, A., Gobert, J. G., Balkan, S., Derouin, F. y Agence Nationale de Recherches sur le, S. S. G.** Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. *N Engl J Med*. 2002; 346 (25): 1963-1969.
- Monis, P. T. y Thompson, R. C.** *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infect Genet Evol*. 2003; 3 (4): 233-244.
- Montemayor, M., Valero, F., Jofre, J. y Lucena, F.** Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. *J Appl Microbiol*. 2005; 99 (6): 1455-1462.
- Moretto, M. M., Khan, I. A. y Weiss, L. M.** Gastrointestinal cell mediated immunity and the microsporidia. *PLoS Pathog*. 2012; 8 (7): e1002775.
- Mota, P., Rauch, C. A. y Edberg, S. C.** Microsporidia and *Cyclospora*: epidemiology and assessment of risk from the environment. *Crit Rev Microbiol*. 2000; 26 (2): 69-90.
- Moulin, L., Richard, F., Stefania, S., Goulet, M., Gosselin, S., Goncalves, A., Rocher, V., Paffoni, C. y Dumetre, A.** Contribution of treated wastewater to the microbiological quality of Seine River in Paris. *Water Res*. 2010; 44 (18): 5222-5231.
- Moura, H., Schwartz, D. A., Bornay-Llinares, F., Sodre, F. C., Wallace, S. y Visvesvara, G. S.** A new and improved "quick-hot Gram-chromotrope" technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue sections. *Arch Pathol Lab Med*. 1997; 121 (8): 888-893.
- Muller, A., Bialek, R., Kamper, A., Fatkenheuer, G., Salzberger, B. y Franzen, C.** Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *J Clin Microbiol*. 2001; 39 (4): 1630-1632.
- Navajas, R., González Castela, G., Fenoy, S. y Del Aguila, C.** Diarrea del viajero por *Cyclospora cayetanensis* en España: a propósito de un caso. *Enfermedades Emergentes*. 2004; 6: 33-37.
- Navarro-i-Martinez, L., del Aguila, C. y Bornay-Llinares, F. J.** [*Cryptosporidium*: a genus in revision. The situation in Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29 (2): 135-143.
- Negm, A. Y.** Human pathogenic protozoa in bivalves collected from local markets in Alexandria. *J Egypt Soc Parasitol*. 2003; 33 (3): 991-998.
- Nichols, R. A., Connelly, L., Sullivan, C. B. y Smith, H. V.** Identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in Scottish raw and drinking waters during a one-year monitoring period. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76 (17): 5977-5986.

- NIH.** National Institute of Health. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Biodefense Research Agenda for Category B and C Priority Pathogens. <http://biodefense.niaid.nih.gov>. 2003.
- O'Connor, R. M., Wanyiri, J. W., Cevallos, A. M., Priest, J. W. y Ward, H. D.** *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15. *Mol Biochem Parasitol.* 2007; 156 (1): 80-83.
- O'Hara, S. P. y Chen, X. M.** The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes Infect.* 2011; 13 (8-9): 721-730.
- Ojuromi, O. T., Izquierdo, F., Fenoy, S., Fagbenro-Beyioku, A., Oyibo, W., Akanmu, A., Odunukwe, N., Henriques-Gil, N. y del Aguila, C.** Identification and characterization of microsporidia from fecal samples of HIV-positive patients from Lagos, Nigeria. *PLoS One.* 2012; 7 (4): e35239.
- Olivier, C., van de Pas, S., Lepp, P. W., Yoder, K. y Relman, D. A.** Sequence variability in the first internal transcribed spacer region within and among *Cyclospora* species is consistent with polyparasitism. *Int J Parasitol.* 2001; 31 (13): 1475-1487.
- Orlandi, P. A., Carter, L., Brinker, A. M., da Silva, A. J., Chu, D. M., Lampel, K. A. y Monday, S. R.** Targeting single-nucleotide polymorphisms in the 18S rRNA gene to differentiate *Cyclospora* species from *Eimeria* species by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69 (8): 4806-4813.
- Ortega, M., Vergara, A., Guimbao, J., Clavel, A., Gavin, P. y Ruiz, A.** Brote de diarrea y transmisión de *Cryptosporidium hominis* asociados al uso de pañal en niños. *Med Clin (Barc).* 2006; 127 (17): 653-656.
- Ortega, Y. R., Gilman, R. H. y Sterling, C. R.** A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from humans. *J Parasitol.* 1994; 80 (4): 625-629.
- Ortega, Y. R. y Sanchez, R.** Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23 (1): 218-234.
- Ortega, Y. R., Sterling, C. R., Gilman, R. H., Cama, V. A. y Diaz, F.** *Cyclospora* species--a new protozoan pathogen of humans. *N Engl J Med.* 1993; 328 (18): 1308-1312.
- Ouarzane-Amara, M., Franetich, J. F., Mazier, D., Pettit, G. R., Meijer, L., Doerig, C. y Desportes-Livage, I.** In vitro activities of two antimitotic compounds, pancratistatin and 7-deoxynarciclasine, against *Encephalitozoon intestinalis*, a microsporidium causing infections in humans. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45 (12): 3409-3415.
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. y Morita, K.** Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol.* 2008; 18 (6): 407-421.
- Pedraza-Diaz, S., Ortega-Mora, L. M., Carrion, B. A., Navarro, V. y Gomez-Bautista, M.** Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pet reptiles. *Vet Parasitol.* 2009; 160 (3-4): 204-210.
- Peng, M. M., Wilson, M. L., Holland, R. E., Meshnick, S. R., Lal, A. A. y Xiao, L.** Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan: implications for understanding the transmission dynamics. *Parasitol Res.* 2003; 90 (3): 175-180.

- Perez, E., Pena, A., Tango, M., Perez, M., Maldonado, M. y Rodriguez, M.** Outbreak of cryptosporidiosis in Guadarrama (autonomous community of Madrid). *Rev. Esp. Salud Publica.* 2000; 74: 527-536.
- Peyretailade, E., El Alaoui, H., Diogon, M., Polonais, V., Parisot, N., Biron, D. G., Peyret, P. y Delbac, F.** Extreme reduction and compaction of microsporidian genomes. *Res Microbiol.* 2011; 162 (6): 598-606.
- Polley, S. D., Boadi, S., Watson, J., Curry, A. y Chiodini, P. L.** Detection and species identification of microsporidial infections using SYBR Green real-time PCR. *J Med Microbiol.* 2011; 60 (Pt 4): 459-466.
- Pombert, J. F., Selman, M., Burki, F., Bardell, F. T., Farinelli, L., Solter, L. F., Whitman, D. W., Weiss, L. M., Corradi, N. y Keeling, P. J.** Gain and loss of multiple functionally related, horizontally transferred genes in the reduced genomes of two microsporidian parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109 (31): 12638-12643.
- Power, M. L. y Ryan, U. M.** A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *J Parasitol.* 2008; 94 (5): 1114-1117.
- Prüss-Üstün, A. y Corvalán, C.** Organización Mundial de la Salud. Ambientes saludables y prevención de enfermedades. Hacia una estimación de la carga de morbilidad atribuible al medio ambiente. http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/previdisexecsumsp.pdf. 2006.
- Puente, S., Morente, A., Garcia-Benayas, T., Subirats, M., Gascon, J. y Gonzalez-Lahoz, J. M.** Cyclosporiasis: a point source outbreak acquired in Guatemala. *J Travel Med.* 2006; 13 (6): 334-337.
- Putignani, L. y Menichella, D.** Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen cryptosporidium. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2010; 2010: pii: 753512.
- Rabodonirina, M., Cotte, L., Radenne, S., Besada, E. y Trepo, C.** Microsporidiosis and transplantation: a retrospective study of 23 cases. *J Eukaryot Microbiol.* 2003; 50 Suppl: 583.
- Rabold, J. G., Hoge, C. W., Shlim, D. R., Kefford, C., Rajah, R. y Echeverria, P.** *Cyclospora* outbreak associated with chlorinated drinking water. *Lancet.* 1994; 344 (8933): 1360-1361.
- Ramirez-Olivencia, G., Herrero, M. D., Subirats, M., Rivas Gonzalez, P. y Puente, S.** [*Cyclospora cayetanensis* outbreak in travelers to Cuba]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008; 26 (9): 558-560.
- Ramirez, N. E., Ward, L. A. y Sreevatsan, S.** A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes Infect.* 2004; 6 (8): 773-785.
- Raynaud, L., Delbac, F., Broussolle, V., Rabodonirina, M., Girault, V., Wallon, M., Cozon, G., Vivares, C. P. y Peyron, F.** Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR amplification. *J Clin Microbiol.* 1998; 36 (1): 37-40.

- Reetz, J., Nockler, K., Reckinger, S., Vargas, M. M., Weiske, W. y Broglia, A.** Identification of *Encephalitozoon cuniculi* genotype III and two novel genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in swine. *Parasitol Int.* 2009; 58 (3): 285-292.
- Reetz, J., Rinder, H., Thomschke, A., Manke, H., Schwebs, M. y Bruderek, A.** First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). *Int J Parasitol.* 2002; 32 (7): 785-787.
- Reinoso, R. y Becares, E.** The occurrence of intestinal parasites in swine slurry and their removal in activated sludge plants. *Bioresour Technol.* 2008; 99 (14): 6661-6665.
- Relman, D. A., Schmidt, T. M., Gajadhar, A., Sogin, M., Cross, J., Yoder, K., Sethabutr, O. y Echeverria, P.** Molecular phylogenetic analysis of *Cyclospora*, the human intestinal pathogen, suggests that it is closely related to *Eimeria* species. *J Infect Dis.* 1996; 173 (2): 440-445.
- Ren, X., Zhao, J., Zhang, L., Ning, C., Jian, F., Wang, R., Lv, C., Wang, Q., Arrowood, M. J. y Xiao, L.** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp Parasitol.* 2012; 130 (3): 274-281.
- Ribeiro, M. F. y Guimaraes, A. M.** *Encephalitozoon*-like microsporidia in the ticks *Amblyomma cajennense* and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 1998; 35 (6): 1029-1033.
- Richardson, R. F., Jr., Remler, B. F., Katirji, B. y Murad, M. H.** Guillain-Barre syndrome after *Cyclospora* infection. *Muscle Nerve.* 1998; 21 (5): 669-671.
- Rinder, H., Katzwinkel-Wladarsch, S. y Loscher, T.** Evidence for the existence of genetically distinct strains of *Enterocytozoon bieneusi*. *Parasitol Res.* 1997; 83 (7): 670-672.
- Rinder, H., Katzwinkel-Wladarsch, S., Thomschke, A. y Loscher, T.** Strain differentiation in microsporidia. *Tokai J Exp Clin Med.* 1998; 23 (6): 433-437.
- Robertson, L. J. y Chalmers, R. M.** Foodborne cryptosporidiosis: is there really more in Nordic countries? *Trends Parasitol.* 2013; 29 (1): 3-9.
- Robertson, L. J. y Gjerde, B.** Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw waters in Norway. *Scand J Public Health.* 2001; 29 (3): 200-207.
- Robinson, G., Chalmers, R. M., Stapleton, C., Palmer, S. R., Watkins, J., Francis, C. y Kay, D.** A whole water catchment approach to investigating the origin and distribution of *Cryptosporidium* species. *J Appl Microbiol.* 2011; 111 (3): 717-730.
- Rodriguez-Manzano, J., Alonso, J. L., Ferrus, M. A., Moreno, Y., Amoros, I., Calgua, B., Hundesa, A., Guerrero-Latorre, L., Carratala, A., Rusinol, M. y Girones, R.** Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water. *Water Sci Technol.* 2012; 66 (12): 2517-2523.
- Rodriguez-Salinas, P., Aragon Pena, A., Allue, T., Lopaz Perez, M., Jimenez, M. y Dominguez Rodriguez, M.** Outbreak of cryptosporidiosis in Guadarrama (Autonomous Community of Madrid). *Rev Esp Salud Publica.* 2000; 74: 527-536.
- Rose, J. B., Huffman, D. E. y Gennaccaro, A.** Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. *FEMS Microbiol Rev.* 2002; 26 (2): 113-123.

- Rossi, P., La Rosa, G., Ludovisi, A., Tamburrini, A., Gomez Morales, M. A. y Pozio, E.** Identification of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* type I from Italy. *Int J Parasitol.* 1998; 28 (9): 1361-1366.
- Rubiano, M. E., Agullo-Barcelo, M., Casas-Mangas, R., Jofre, J. y Lucena, F.** Assessing the effects of tertiary treated wastewater reuse on a Mediterranean river (Llobregat, NE Spain), part III: pathogens and indicators. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2012; 19 (4): 1026-1032.
- Rueda, C., Fenoy, S., Simon, F. y Del Aguila, C.** Bobel-24 activity against *Cryptosporidium parvum* in cell culture and in a SCID mouse model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (3): 1150-1152.
- Ryan, N. J., Sutherland, G., Coughlan, K., Globan, M., Doultree, J., Marshall, J., Baird, R. W., Pedersen, J. y Dwyer, B.** A new trichrome-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool, and nasopharyngeal specimens. *J Clin Microbiol.* 1993; 31 (12): 3264-3269.
- Ryan, U. M., Power, M. y Xiao, L.** *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J Eukaryot Microbiol.* 2008; 55 (1): 22-26.
- Sadler, F., Peake, N., Borrow, R., Rowl, P. L., Wilkins, E. G. y Curry, A.** Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in AIDS patients from the north west of England. *J Infect.* 2002; 44 (1): 39-42.
- Saigal, K., Sharma, A., Sehgal, R., Sharma, P., Malla, N. y Khurana, S.** Intestinal microsporidiosis in India: A two year study. *Parasitol Int.* 2012;
- Sak, B., Brady, D., Pelikanova, M., Kvetonova, D., Rost, M., Kostka, M., Tolarova, V., Huzova, Z. y Kvac, M.** Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *J Clin Microbiol.* 2011; 49 (3): 1064-1070.
- Salat, J., Jelinek, J., Chmelar, J. y Kopecky, J.** Efficacy of gamma interferon and specific antibody for treatment of microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (6): 2169-2174.
- Santin, M. y Fayer, R.** *Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. *J Eukaryot Microbiol.* 2009; 56 (1): 34-38.
- Santin, M. y Fayer, R.** Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. *Res Vet Sci.* 2011; 90 (3): 363-371.
- Santin, M., Trout, J. M., Vecino, J. A., Dubey, J. P. y Fayer, R.** *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. *Vet Parasitol.* 2006; 141 (3-4): 334-339.
- Savichtcheva, O. y Okabe, S.** Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Res.* 2006; 40 (13): 2463-2476.
- Schottelius, J. y da Costa, S. C.** Microsporidia and acquired immunodeficiency syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000; 95 Suppl 1: 133-139.
- Semenza, J. C. y Nichols, G.** Cryptosporidiosis surveillance and water-borne outbreaks in Europe. *Euro Surveill.* 2007; 12 (5): E13-14.

- Shadduck, J. A. y Greeley, E.** Microsporidia and human infections. Clin Microbiol Rev. 1989; 2 (2): 158-165.
- Sharma, S., Sachdeva, P. y Viridi, J. S.** Emerging water-borne pathogens. Appl Microbiol Biotechnol. 2003; 61 (5-6): 424-428.
- Shen, Y., Yin, J., Yuan, Z., Lu, W., Xu, Y., Xiao, L. y Cao, J.** The identification of the *Cryptosporidium ubiquitum* in pre-weaned Ovines from Aba Tibetan and Qiang autonomous prefecture in China. Biomed Environ Sci. 2011; 24 (3): 315-320.
- Sherchand, J. B., Cross, J. H., Jimba, M., Sherchand, S. y Shrestha, M. P.** Study of *Cyclospora cayetanensis* in health care facilities, sewage water and green leafy vegetables in Nepal. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1999; 30 (1): 58-63.
- Shields, J. M., Joo, J., Kim, R. y Murphy, H. R.** Assessment of three commercial DNA extraction kits and a laboratory-developed method for detecting *Cryptosporidium* and *Cyclospora* in raspberry wash, basil wash and pesto. J Microbiol Methods. 2013; 92 (1): 51-58.
- Shields, J. M. y Olson, B. H.** *Cyclospora cayetanensis*: a review of an emerging parasitic coccidian. Int J Parasitol. 2003; 33 (4): 371-391.
- Shlim, D. R.** *Cyclospora cayetanensis*. Clin Lab Med. 2002; 22 (4): 927-936.
- Sing, A., Tybus, K., Heesemann, J. y Mathis, A.** Molecular diagnosis of an *Enterocytozoon bieneusi* human genotype C infection in a moderately immunosuppressed human immunodeficiency virus seronegative liver-transplant recipient with severe chronic diarrhea. J Clin Microbiol. 2001; 39 (6): 2371-2372.
- Skotarczak, B.** Progress in the molecular methods for the detection and genetic characterization of *Cryptosporidium* in water samples. Ann Agric Environ Med. 2010; 17 (1): 1-8.
- Slamovits, C. H., Fast, N. M., Law, J. S. y Keeling, P. J.** Genome compaction and stability in microsporidian intracellular parasites. Curr Biol. 2004; 14 (10): 891-896.
- Slifko, T. R., Smith, H. V. y Rose, J. B.** Emerging parasite zoonoses associated with water and food. Int J Parasitol. 2000; 30 (12-13): 1379-1393.
- Ślodka-Kowalska, A., Graczyk, T. K., Tamang, L., Jedrzejewski, S., Nowosad, A., Zduniak, P., Solarczyk, P., Girouard, A. S. y Majewska, A. C.** Microsporidian species known to infect humans are present in aquatic birds: implications for transmission via water? Appl Environ Microbiol. 2006; 72 (7): 4540-4544.
- Smerdon, W.** Cryptosporidiosis outbreak associated with Majorcan hotel. Eurosurveillance. 2000; 4 (34): pii=2275.
- Smith, H. V., Caccio, S. M., Tait, A., McLauchlin, J. y Thompson, R. C.** Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. Trends Parasitol. 2006; 22 (4): 160-167.
- Smith, H. V. y Nichols, R. A.** *Cryptosporidium*: detection in water and food. Exp Parasitol. 2010; 124 (1): 61-79.
- Smith, H. V., Nichols, R. A. y Grimason, A. M.** *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. Trends Parasitol. 2005; 21 (3): 133-142.
- Snowden, K. y Logan, K.** Molecular identification of *Encephalitozoon hellem* in an ostrich. Avian Dis. 1999; 43 (4): 779-782.

- Soba, B. y Logar, J.** Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. *Parasitology*. 2008; 135 (11): 1263-1270.
- Sobottka, I., Albrecht, H., Visvesvara, G. S., Pieniazek, N. J., Deplazes, P., Schwartz, D. A., Laufs, R. y Elsner, H. A.** Inter- and intra-species karyotype variations among microsporidia of the genus *Encephalitozoon* as determined by pulsed-field gel electrophoresis. *Scand J Infect Dis*. 1999; 31 (6): 555-558.
- Sobottka, I., Schwartz, D. A., Schottelius, J., Visvesvara, G. S., Pieniazek, N. J., Schmetz, C., Kock, N. P., Laufs, R. y Albrecht, H.** Prevalence and clinical significance of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with and without diarrhea in Germany: a prospective coprodiagnostic study. *Clin Infect Dis*. 1998; 26 (2): 475-480.
- Sodqi, M., Brazille, P., Gonzalez-Canali, G., Cornet, M., Piketty, C. y Weiss, L.** Unusual pulmonary *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in an AIDS patient: case report and review. *Scand J Infect Dis*. 2004; 36 (3): 230-231.
- Sokolova, O. I., Demyanov, A. V., Bowers, L. C., Didier, E. S., Yakovlev, A. V., Skarlato, S. O. y Sokolova, Y. Y.** Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. *J Clin Microbiol*. 2011; 49 (6): 2102-2108.
- Sparfel, J. M., Sarfati, C., Liguory, O., Caroff, B., Dumoutier, N., Gueglio, B., Billaud, E., Raffi, F., Molina, J. M., Miegerville, M. y Derouin, F.** Detection of microsporidia and identification of *Enterocytozoon bieneusi* in surface water by filtration followed by specific PCR. *J Eukaryot Microbiol*. 1997; 44 (6): 78S.
- Sterling, C. R. y Ortega, Y. R.** *Cyclospora*: an enigma worth unraveling. *Emerg Infect Dis*. 1999; 5 (1): 48-53.
- Strong, W. B., Gut, J. y Nelson, R. G.** Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. *Infect Immun*. 2000; 68 (7): 4117-4134.
- Sturbaum, G. D., Ortega, Y. R., Gilman, R. H., Sterling, C. R., Cabrera, L. y Klein, D. A.** Detection of *Cyclospora cayetanensis* in wastewater. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64 (6): 2284-2286.
- Subirats, M., Gonzalez-Castelao, G. y Aguilera, A.** Diagnostico de 4 casos de microsporidiosis intestinal en enfermos de SIDA. *Enf. Infec. y Microbiol. Clin*. 1996; 14: 533-537.
- Sulaiman, I. M., Fayer, R., Lal, A. A., Trout, J. M., Schaefer, F. W., 3rd y Xiao, L.** Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals Harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69 (8): 4495-4501.
- Sulaiman, I. M., Hira, P. R., Zhou, L., Al-Ali, F. M., Al-Shelahi, F. A., Shweiki, H. M., Iqbal, J., Khalid, N. y Xiao, L.** Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (6): 2805-2809.
- Sulaiman, I. M., Lal, A. A. y Xiao, L.** A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites. *J Eukaryot Microbiol*. 2001; Suppl: 24S-27S.

- Talabani, H., Sarfati, C., Pillebout, E., van Gool, T., Derouin, F. y Menotti, J.** Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. *J Clin Microbiol.* 2010; 48 (7): 2651-2653.
- Tanriverdi, S., Grinberg, A., Chalmers, R. M., Hunter, P. R., Petrovic, Z., Akiyoshi, D. E., London, E., Zhang, L., Tzipori, S., Tumwine, J. K. y Widmer, G.** Inferences about the global population structures of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74 (23): 7227-7234.
- Tello, O. y Rodriguez, M.** Vigilancia Epidemiológica de la criptosporidiosis en España. . Boletín epidemiológico semanal: vigilancia epidemiológica. 2003; 11 (24): 277-280.
- ten Hove, R. J., Van Lieshout, L., Beadsworth, M. B., Perez, M. A., Spee, K., Claas, E. C. y Verweij, J. J.** Characterization of genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in immunosuppressed and immunocompetent patient groups. *J Eukaryot Microbiol.* 2009; 56 (4): 388-393.
- Thellier, M. y Breton, J.** *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite.* 2008; 15 (3): 349-358.
- Thurston-Enriquez, J. A., Watt, P., Dowd, S. E., Enriquez, R., Pepper, I. L. y Gerba, C. P.** Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *J Food Prot.* 2002; 65 (2): 378-382.
- Torres, G., Izquierdo, F., Capo, V., Lopez, L. X., Lopez, M. C., Limonta, D., Fenoy, S., Del Aguila, C. y Bornay-Llinares, F. J.** Genital microsporidiosis in women with AIDS: a post-mortem study. *Rev Iberoam Micol.* 2013; 30 (1): 47-50.
- Torres, J., Gracenea, M., Gomez, M. S., Arrizabalaga, A. y Gonzalez-Moreno, O.** The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Vet Parasitol.* 2000; 92 (4): 253-260.
- Tosoni, A., Nebuloni, M., Ferri, A., Bonetto, S., Antinori, S., Scaglia, M., Xiao, L., Moura, H., Visvesvara, G. S., Vago, L. y Costanzi, G.** Disseminated microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* III (dog type) in an Italian AIDS patient: a retrospective study. *Mod Pathol.* 2002; 15 (5): 577-583.
- Tram, N. T., Hoang, L. M., Cam, P. D., Chung, P. T., Fyfe, M. W., Isaac-Renton, J. L. y Ong, C. S.** *Cyclospora* spp. in herbs and water samples collected from markets and farms in Hanoi, Vietnam. *Trop Med Int Health.* 2008; 13 (11): 1415-1420.
- Tree, J. A., Adams, M. R. y Lees, D. N.** Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69 (4): 2038-2043.
- Tumwine, J. K., Kekitiinwa, A., Bakeera-Kitaka, S., Ndeezi, G., Downing, R., Feng, X., Akiyoshi, D. E. y Tzipori, S.** Cryptosporidiosis and microsporidiosis in ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73 (5): 921-925.
- Turgay, N., Yolasigmaz, A., Erdogan, D. D., Zeyrek, F. Y. y Uner, A.** Incidence of cyclosporiasis in patients with gastrointestinal symptoms in western Turkey. *Med Sci Monit.* 2007; 13 (1): CR34-39.
- Tzipori, S. y Ward, H.** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect.* 2002; 4 (10): 1047-1058.
- Tzipori, S. y Widmer, G.** A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends Parasitol.* 2008; 24 (4): 184-189.

- Undeen, A. H. y Vander Meer, R. K.** Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. *J Invertebr Pathol.* 1999; 73 (3): 294-302.
- Valencakova, A., Balent, P., Ravaszova, P., Horak, A., Obornik, M., Halanova, M., Malcekova, B., Novotny, F. y Goldova, M.** Molecular identification and genotyping of Microsporidia in selected hosts. *Parasitol Res.* 2012; 110 (2): 689-693.
- Valperga, S. M., de Jogna Prat, S. A., de Valperga, G. J., Lazarte, S. G., de Trejo, A. V., Diaz, N. y Huttman, H. M.** [Microsporidian spores in the stool specimens of toddlers, with or without diarrhea, from Tucuman, Argentina]. *Rev Argent Microbiol.* 1999; 31 (3): 157-164.
- Van de Peer, Y., Ben Ali, A. y Meyer, A.** Microsporidia: accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi. *Gene.* 2000; 246 (1-2): 1-8.
- Van Dyke, M. I., Ong, C. S., Prystajek, N. A., Isaac-Renton, J. L. y Huck, P. M.** Identifying host sources, human health risk and indicators of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a Canadian watershed influenced by urban and rural activities. *J Water Health.* 2012; 10 (2): 311-323.
- Varma, M., Hester, J. D., Schaefer, F. W., 3rd, Ware, M. W. y Lindquist, H. D.** Detection of *Cyclospora cayetanensis* using a quantitative real-time PCR assay. *J Microbiol Methods.* 2003; 53 (1): 27-36.
- Verweij, J. J., Laeijendecker, D., Brien, E. A., van Lieshout, L. y Polderman, A. M.** Detection of *Cyclospora cayetanensis* in travellers returning from the tropics and subtropics using microscopy and real-time PCR. *Int J Med Microbiol.* 2003; 293 (2-3): 199-202.
- Verweij, J. J., Ten Hove, R., Brien, E. A. y van Lieshout, L.** Multiplex detection of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. in fecal samples using real-time PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 57 (2): 163-167.
- Vesey, G., Ashbolt, N., Fricker, E. J., Deere, D., Williams, K. L., Veal, D. A. y Dorsch, M.** The use of a ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe for fluorescent labelling of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Appl Microbiol.* 1998; 85 (3): 429-440.
- Visvesvara, G. S.** In vitro cultivation of microsporidia of clinical importance. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15 (3): 401-413.
- Visvesvara, G. S., Belloso, M., Moura, H., Da Silva, A. J., Moura, I. N., Leitch, G. J., Schwartz, D. A., Chevez-Barrios, P., Wallace, S., Pieniazek, N. J. y Goosey, J. D.** Isolation of *Nosema algerae* from the cornea of an immunocompetent patient. *J Eukaryot Microbiol.* 1999; 46 (5): 10S.
- Visvesvara, G. S., Moura, H., Kovacs-Nace, E., Wallace, S. y Eberhard, M. L.** Uniform staining of *Cyclospora* oocysts in fecal smears by a modified safranin technique with microwave heating. *J Clin Microbiol.* 1997; 35 (3): 730-733.
- Visvesvara, G. S., Moura, H., Leitch, G. J., Schwartz, D. A. y Xiao, L. X.** Public health importance of *Brachiola algerae* (Microsporidia)--an emerging pathogen of humans. *Folia Parasitol (Praha).* 2005; 52 (1-2): 83-94.
- Vuong, T. A., Nguyen, T. T., Klank, L. T., Phung, D. C. y Dalsgaard, A.** Faecal and protozoan parasite contamination of water spinach (*Ipomoea aquatica*) cultivated

in urban wastewater in Phnom Penh, Cambodia. Trop Med Int Health. 2007; 12 Suppl 2: 73-81.

Wanachiwanawin, D., Chokephaibulkit, K., Lertlaituan, P., Ongrotchanakun, J., Chinabut, P. y Thakerngpol, K. Intestinal microsporidiosis in HIV-infected children with diarrhea. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2002; 33 (2): 241-245.

Wang, Z., Orlandi, P. A. y Stenger, D. A. Simultaneous detection of four human pathogenic microsporidian species from clinical samples by oligonucleotide microarray. J Clin Microbiol. 2005; 43 (8): 4121-4128.

Wanke, C. A., DeGirolami, P. y Federman, M. *Enterocytozoon bieneusi* infection and diarrheal disease in patients who were not infected with human immunodeficiency virus: case report and review. Clin Infect Dis. 1996; 23 (4): 816-818.

Weber, R., Bryan, R. T., Owen, R. L., Wilcox, C. M., Gorelkin, L. y Visvesvara, G. S. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The Enteric Opportunistic Infections Working Group. N Engl J Med. 1992; 326 (3): 161-166.

Weber, R., Bryan, R. T., Schwartz, D. A. y Owen, R. L. Human microsporidial infections. Clin Microbiol Rev. 1994; 7 (4): 426-461.

Weidner, E., Canning, E. U., Rutledge, C. R. y Meek, C. L. Mosquito (Diptera: Culicidae) host compatibility and vector competency for the human myositic parasite *Trachipleistophora hominis* (Phylum Microspora). J Med Entomol. 1999; 36 (4): 522-525.

WHO. World Health Organization. Waterborne zoonotic protozoa: Identification, Causes and Control. http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/zoonoses.pdf. 2004.

Widmer, G. y Akiyoshi, D. E. Host-specific segregation of ribosomal nucleotide sequence diversity in the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi*. Infect Genet Evol. 2010; 10 (1): 122-128.

Widmer, G. y Sullivan, S. Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. Parasite Immunol. 2012; 34 (2-3): 61-71.

Williams, A. P. y Keeling, P. J. Microsporidia- Highly reduced and derived relatives of fungi. The mycota. A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. XIV Evolution of Fungi and Fungal-Like Organisms. 2011. Heidelberg. Springer.

Williams, B. A., Hirt, R. P., Lucocq, J. M. y Embley, T. M. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. Nature. 2002; 418 (6900): 865-869.

Williams, B. A., Lee, R. C., Becnel, J. J., Weiss, L. M., Fast, N. M. y Keeling, P. J. Genome sequence surveys of *Brachiola algerae* and *Edhazardia aedis* reveal microsporidia with low gene densities. BMC Genomics. 2008; 9: 200.

Wolk, D. M., Schneider, S. K., Wengenack, N. L., Sloan, L. M. y Rosenblatt, J. E. Real-time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens. J Clin Microbiol. 2002; 40 (11): 3922-3928.

- Wumba, R., Longo-Mbenza, B., Menotti, J., Mandina, M., Kintoki, F., Situakibanza, N. H., Kakicha, M. K., Zanga, J., Mbanzulu-Makola, K., Nseka, T., Mukendi, J. P., Kendjo, E., Sala, J. y Thellier, M. Epidemiology, clinical, immune, and molecular profiles of microsporidiosis and cryptosporidiosis among HIV/AIDS patients. *Int J Gen Med.* 2012; 5: 603-611.
- Xiao, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol.* 2010; 124 (1): 80-89.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U. y Upton, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17 (1): 72-97.
- Xiao, L., Li, L., Moura, H., Sulaiman, I., Lal, A. A., Gatti, S., Scaglia, M., Didier, E. S. y Visvesvara, G. S. Genotyping *Encephalitozoon hellem* isolates by analysis of the polar tube protein gene. *J Clin Microbiol.* 2001; 39 (6): 2191-2196.
- Xiao, L., Li, L., Moura, H., Sulaiman, I. M., Lal, A. A., Gatti, S., Scaglia, M., Didier, E. S. y Visvesvara, G. S. Genotyping *Encephalitozoon* parasites using multilocus analyses of genes with repetitive sequences. *J Eukaryot Microbiol.* 2001; Suppl: 63S-65S.
- Xiao, L., Li, L., Visvesvara, G. S., Moura, H., Didier, E. S. y Lal, A. A. Genotyping *Encephalitozoon cuniculi* by multilocus analyses of genes with repetitive sequences. *J Clin Microbiol.* 2001; 39 (6): 2248-2253.
- Xiao, L. y Ryan, U. M. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr Opin Infect Dis.* 2004; 17 (5): 483-490.
- Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L. S., Alves, J. M., Serrano, M. G., Puiu, D., Manque, P., Akiyoshi, D., Mackey, A. J., Pearson, W. R., Dear, P. H., Bankier, A. T., Peterson, D. L., Abrahamsen, M. S., Kapur, V., Tzipori, S. y Buck, G. A. The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature.* 2004; 431 (7012): 1107-1112.
- Yang, W., Chen, P., Villegas, E. N., Landy, R. B., Kanetsky, C., Cama, V., Dearen, T., Schultz, C. L., Orndorff, K. G., Prelewicz, G. J., Brown, M. H., Young, K. R. y Xiao, L. *Cryptosporidium* source tracking in the Potomac River watershed. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74 (21): 6495-6504.
- Zar, F. A., El-Bayoumi, E. y Yungbluth, M. M. Histologic proof of acalculous cholecystitis due to *Cyclospora cayetanensis*. *Clin Infect Dis.* 2001; 33 (12): E140-141.
- Zarlenga, D. S. y Trout, J. M. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. *Vet Parasitol.* 2004; 126 (1-2): 195-217.
- Zerpa, R., Uchima, N. y Huicho, L. *Cyclospora cayetanensis* associated with watery diarrhoea in Peruvian patients. *J Trop Med Hyg.* 1995; 98 (5): 325-329.
- Zhou, L., Singh, A., Jiang, J. y Xiao, L. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (11): 5254-5257.